

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MIR-146a-5p, MIR-155-5p VE MIR-196a2-5p’NİN PLAZMA EKSPRESYON
SEVİYELERİ VE GENETİK POLİMORFİZMLERİNİN MULTİPL
SKLEROZ RİSKİ, ENGELLİLİK SKORLARI VE FİNGOLİMOD TEDAVİSİ
İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ata Ayhan YILMAZ

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

AĞUSTOS 2024



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MIR-146a-5p, MIR-155-5p VE MIR-196a2-5p’NİN PLAZMA EKSPRESYON
SEVİYELERİ VE GENETİK POLİMORFİZMLERİNİN MULTİPL SKLEROZ
RİSKİ, ENGELLİLİK SKORLARI VE FİNGOLİMOD TEDAVİSİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Ata Ayhan YILMAZ

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniveritesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomedikal Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Tarih: Ağustos 2024

Multipl Skleroz (MS), genç yetişkinlerde travma harici nörolojik engelliliğin en yaygın sebebi olan; kronik enflamatuar, otoimmün, nörodejeneratif ve demiyelinizan bir merkezi sinir sistemi (MSS) hastalığıdır. Fingolimod, MS’in en yaygın klinik alt formu olan ataklarla seyreden MS (RRMS) tedavisinde ikinci basamakta kullanılan ve ağızdan alınan immün-baskılayıcı bir ajandır. Gen ifadesinin düzenlenmesinde görev alan mikroRNA’lar (miRNA) birçok hastalığın teşhisi ve seyri ile ilişkilendirilmiş olup biyobelirteç keşif çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadır. miRNA’ların genlerinde bulunan tek nükleotit polimorfizmleri (SNP) bu miRNA’ların ekspresyon seviyelerine etki etmektedir. Bu tez çalışmasında, enflamatuar ve bağışıklık yanıtlarının oluşmasıyla ilişkili olan miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p’nin dolaşımdaki ekspresyon seviyeleri ve bu miRNA’ların genlerinde bulunan SNP’lerin (rs2910164, rs767649 ve rs11614913) MS hastalığı riski ile ilişkisi incelenmiştir. Bu

SNP'lerin miRNA plazma ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri, SNP'lerin Türk toplumunda MS'e yatkınlıktaki rolleri ve miRNA plazma ekspresyon seviyelerinin MS hastalığının teşhisi ve tedavinin etkilerinin gözlemlenebilmesi için biyobelirteç olma potansiyelleri değerlendirilmiştir. 400 RRMS ve 400 kontrol katılımcısından oluşan Grup-1'de *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin genotiplmeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grup-1 içerisinde bulunan ve rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif (tedavi almayan) RRMS, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS ve 30 kontrol katılımcısının bulunduğu Grup-2'de plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği'nden alınmıştır.

Bu tez çalışmasında *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin T aleli Türk toplumunda RRMS riski ile ve *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin GC veya CC genotipine sahip olma durumu hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunmuştur. Plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında, naif RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar miR-155-5p'nin ve miR-196a-5p'nin fingolimod tedavisi için potansiyel terapötik hedefler olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasıyla ilk defa Türk toplumunda *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin RRMS hastalığı riskiyle ilişkisi incelenmiş ve daha önce MS ile ilişkisi hiç çalışılmamış olan *MIR196A2* rs11614913 SNP'sinin polimorfik T alelinin Türk toplumunda MS hastalığı için bir risk faktörü olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile fingolimod tedavi ajanının arasındaki ilişki gösterilmiştir. Plazmadaki potansiyel biyobelirteç adaylarını ortaya koyan bu bulgular, MS hastalığı için terapötik ajanlar geliştirilmesine, hastalığın progresyonunun ve tedavi yanıtlarının takibi için biyoalgılayıcıların üretilmesine imkan sağlayabilir. Multidisipliner bir yaklaşımın benimsendiği bu tez çalışması, Biyomedikal Mühendisliği alanına önemli katkılarda bulunmuş bir çalışma olarak nitelendirilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Multipl Skleroz, Tek nükleotit polimorfizmi, mikroRNA, Biyobelirteç, Gen ifadesi.

ABSTRACT

Master of Science

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN PLASMA EXPRESSION LEVELS AND GENETIC POLYMORPHISMS OF MIR-146a-5p, MIR-155-5p, MIR-196a2-5p WITH MULTIPLE SCLEROSIS, DISABILITY SCORES AND FINGOLIMOD THERAPY

Ata Ayhan YILMAZ

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Biomedical Engineering Science Programme

Supervisor: Prof. Dr. Birsen CAN DEMİRDÖĞEN

Date: August 2024

Multiple Sclerosis (MS), the most common cause of non-traumatic neurological disability in young adults, is a chronic inflammatory, autoimmune, neurodegenerative and demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Fingolimod is an oral immunosuppressant used in the second-line treatment of relapsing-remitting MS (RRMS), the most common clinical subtype of MS. MicroRNAs (miRNA), which are involved in the regulation of gene expression, are associated with the diagnosis and progression of many diseases and play an important role in biomarker discovery studies. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes of miRNAs influence the expression levels of these miRNAs. In this thesis study, the relation of the circulating expression levels of miR-146a-5p, miR-155-5p and miR-196a-5p, which are associated with the formation of inflammatory and immune responses, and SNPs (rs2910164, rs767649 and rs11614913) in the genes of these miRNAs with the risk of

MS disease were investigated. The effects of these SNPs on miRNA plasma expression levels, the role of SNPs in susceptibility to MS in the Turkish population, and the potential of miRNA plasma expression levels as biomarkers for diagnosing MS disease and for monitoring the effects of treatment were evaluated. In Group-1, consisting of 400 RRMS and 400 control participants, genotyping of SNPs *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 and *MIR196A2* rs11614913 was performed using real-time polymerase chain reaction. In Group-2, which included 30 naïve (non-treated) RRMS participants, 29 RRMS participants treated with fingolimod and 30 control participants randomly selected from Group-1, plasma relative expressions levels of miR-146a-5p, miR-155-5p and miR-196a-5p were determined by quantitative real-time PCR. Samples were collected at the Ankara Bilkent City Hospital Neurology Polyclinic.

In this thesis study, the T allele of the *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP was found to be associated with the risk of RRMS in the Turkish population, and having the GC or CC genotype of the *MIR146A* rs2910164 G/C SNP was found to be associated with the risk of rapid MS progression (MSSS>5). The relative expression of miR-155-5p and miR-196a-5p in plasma was statistically significantly lower in RRMS patients treated with fingolimod than in naïve RRMS patients. These results suggest miR-155-5p and miR-196a-5p may be potential therapeutic targets for fingolimod treatment.

Within this dissertation study, the association between SNPs *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 and *MIR196A2* rs11614913 and the risk of RRMS disease was investigated for the first time in the Turkish population, and it was revealed that the polymorphic T allele of SNP *MIR196A2* rs11614913, whose association with MS has not been investigated before, is a risk factor for MS disease in the Turkish population. In addition, the association between the relative expression levels of miR-155-5p and miR-196a-5p in plasma and fingolimod treatment agent was demonstrated. These findings, which reveal potential biomarker candidates in plasma, could enable the development of therapeutics for MS diseases and the production of biosensors to monitor disease progression and response to treatment. This work, which takes a multidisciplinary approach, is described as a study that has made a significant contribution to the field of Biomedical Engineering.

Keywords: Multiple Sclerosis, Single nucleotide polymorphisms, microRNA, Biomarker, Gene expression.

TEŞEKKÜR

İlk olarak bana laboratuvarında ve ekibinde çalışma fırsatı sunan, tüm tez ve akademik çalışmalarım boyunca tecrübeleriyle ışık olan, gelişimimde çok önemli katkılar sunan ve sadece yüksek lisans eğitimimde değil hayatta da başarılı olmamı sağlayacak kıymetli paylaşımlarda bulunan saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Birsan Can Demirdöğen'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TOBB ETÜ'de geçirdiğim lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca çok değerli bilgi ve birikimlerini bir an bile biz öğrencilerinden esirgemeyen değerli TOBB ETÜ Biyomedikal Mühendisliği öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının örnek gruplarının oluşturulmasında ve katılımcıların çalışmaya dahil edilmesi konusunda yardımcı olan, alanındakiengin bilgileriyle her zaman destek olan Prof. Dr. Semra Öztürk Mungan'a ve Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Polikliniği'ne teşekkürlerimi sunarım.

Tez jüri üyelerim saygıdeğer Doç. Dr. Özgül Persil Çetinkol ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma Kübra Erbay Elibol'a değerli eleştirileri, tavsiyeleri ve rehberlikleri için teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca geçirdiğim iyi ve kötü her günde, her zaman destekleriyle ve bilgileriyle yol gösterici olan sevgili hocam Canan Koçan Akçin başta olmak üzere, her zaman iyi birer ekip arkadaşı olan Buse Aydın ve Mekselina Kalmaz'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca daima tecrübelerini ve arkadaşlıklarını benimle paylaşan eski mesai arkadaşlarım ve daha da eski hocalarım Ahmet Ersin Meydan, Ece Bayrak, Farhad Nassehi ve Hatice Ferda Özgüzar'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yol arkadaşlığı etmiş, her zor anımda yanımda olmuş, dostluklarının kıymeti ve bedeli ebedi olan ev arkadaşım Ersin Güven, kadim dostum Burak Solak ve çocukluk arkadaşım sevgili Gülnaz Özbek'e teşekkür ederim.

Bir hocadan fazlası, bir kardeş, bir ağabey ve memleketimden uzakta geçirdiğim eğitim hayatımda ailem olan Osman Oğuzhan Kılıç ve Alkım Aktaş'a desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Hayatımın her anında maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman benden esirgemeyen, bana kattıklarının ve kazandırdıklarının karşılığı olmayan sevgili babam Faruk Yılmaz, canım annem Hülya Yılmaz ve çok kıymetli büyüğüm ağabeyim Kağan Yılmaz'a şükranlarımı sunarım.

Sevginin en kıymetlisini yaşatan, her zaman umut, neşe, heyecan ve mutluluk dolu karakteriyle bu meşakkatli yolculuğu kolay kılan; sevgisinden suâl olunmayacak; kıymetli ve çok değerli hayat arkadaşım, canımın içi Nazlı Ayça Solakoğlu'na şükranlarımı sunarım.

Bu çalışmayı hayatımın en tatlı ve en yeni ferdi olan biricik yeğenim Aslan'a ithaf ediyorum.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xix
KISALTMALAR	xxiii
SEMBOL LİSTESİ	xxvii
1. GİRİŞ	1
1.1 Multipl Skleroz	1
1.1.1 Multipl Sklerozun epidemiyolojisi.....	3
1.1.2 Multipl Sklerozun etiyolojisi.....	5
1.1.2.1 Çevresel faktörler	5
1.1.2.2 Genetik faktörler	8
1.1.3 Multipl Sklerozun patolojisi ve immünopatogenezi	9
1.1.4 Multipl Sklerozun tanısı ve klinik tipleri	12
1.1.4.1 Multipl Sklerozun tanısı	12
1.1.4.2 Multipl Sklerozun klinik tipleri.....	14
1.1.5 Multipl Sklerozda fiziksel engelliliğin değerlendirilmesi.....	17
1.1.6 Multipl Sklerozda tedavi	18
1.1.6.1 Fingolimod	19
1.2 mikroRNA'lar	20
1.2.1 mikroRNA biyogenezi	22
1.2.2 Dolaşımdaki mikroRNA'lar	23
1.2.3 Multipl Sklerozda mikroRNA'ların rolü.....	23
1.2.3.1 hsa-miR-146a-5p.....	26
1.2.3.2 hsa-miR-155-5p	30
1.2.3.3 hsa-miR-196a-5p.....	33
1.3 Tek Nükleotit Polimorfizmleri	36

1.3.1	<i>MIR146A</i> rs2910164 G/C	37
1.3.2	<i>MIR155</i> rs767649 T/A	39
1.3.3	<i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T	40
1.4	Çalışmanın Amacı	41
2.	MATERYALLER VE METOTLAR	45
2.1	Çalışma Grupları ve Materyaller	45
2.1.1	Örnek gruplarının oluşturulması	45
2.1.1.1	Genetik polimorfizm çalışmaları için Grup-1 çalışma popülasyonunun oluşturulması	45
2.1.1.2	Ekspresyon seviyesi çalışmaları için Grup-2 çalışma popülasyonunun oluşturulması	47
2.1.2	Laboratuvar çalışmaları için tam kan örneklerinin toplanması	48
2.1.2.1	Genetik polimorfizm çalışmalarının gerçekleştirileceği Grup-1 için tam kan örneklerinin toplanması	48
2.1.2.2	Plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmalarının gerçekleştirileceği Grup-2 için tam kan örneklerinin toplanması	49
2.1.3	Laboratuvar çalışmalarında kullanılan malzemeler	49
2.1.4	Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cihazlar	49
2.1.5	Prob ve primer dizileri	50
2.1.5.1	Genetik polimorfizm çalışmalarında kullanılan problemler ve primerler	50
2.1.5.2	Plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primerler	50
2.2	Laboratuvar Çalışmaları İçin Kullanılan Metotlar	51
2.2.1	Genotiplerin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmalar	51
2.2.1.1	Tam kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu	51
2.2.1.2	Genomik DNA'nın kalitesinin ve konsantrasyonunun ölçülmesi	52
2.2.2	<i>MIR146A</i> rs2910164 G/C, <i>MIR155</i> rs767649 T/A ve <i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T SNP'lerinin genotipleme çalışmaları	53
2.2.2.1	<i>MIR146A</i> rs2910164 G/C için genotipleme	55
2.2.2.2	<i>MIR155</i> rs767649 T/A için genotipleme	58
2.2.2.3	<i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T için genotipleme	59
2.2.3	Plazma miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	61
2.2.3.1	Tam kan örneklerinden plazma eldesi	61
2.2.3.2	Plazmalardan total RNA izolasyonu	62
2.2.3.3	Total RNA'nın kalitesinin ve konsantrasyonunun ölçülmesi	63

2.2.3.4	Ters transkriptaz PCR metodu ile cDNA sentezi.....	64
2.2.3.5	mikroRNA'ların ekspresyon seviyelerinin kantitatif eş zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmesi.....	65
2.2.4	İstatistiksel ve <i>in silico</i> analizlerin gerçekleştirilmesi için kullanılan metotlar	68
3.	BULGULAR.....	71
3.1	Örnek Grupları	71
3.1.1	Grup-1'in demografik bilgileri.....	71
3.1.2	Grup-2'nin demografik bilgileri.....	72
3.2	Grup-1'de Gerçekleştirilen İstatistiksel Analizler	73
3.2.1	Grup-1'deki RRMS hastalarının klinik bilgileri	73
3.2.2	miRNA SNP'lerinin genotip ve alel frekansları	75
3.2.2.1	MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve alel frekansları ..	75
3.2.2.2	MIR155 rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve alel frekansları	77
3.2.2.3	MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekansları	79
3.2.2.4	SNP genotiplerinin kombinasyonları ile gerçekleştirilen analizler	81
3.2.3	miRNA SNP genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri	83
3.2.3.1	MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri	83
3.2.3.2	MIR155 rs767649 T/A SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri	85
3.2.3.3	MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri	88
3.2.4	Korelasyon analizleri	90
3.2.5	Lojistik regresyon analizleri.....	91
3.2.5.1	MS hastalık riski için yapılan analizler.....	93
3.2.5.2	Orta düzey EDSS riski (EDSS>3) için yapılan analizler	93
3.2.5.3	Hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) için yapılan analizler	95
3.3	Grup-2'de Gerçekleştirilen İstatistiksel Analizler	97
3.3.1	Grup-2 çalışma grubunun klinik bilgileri.....	97
3.3.2	Naif RRMS, fingolimod alan RRMS ve kontrol gruplarında plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri	99
3.3.3	Plazma miRNA seviyeleri ile miRNA SNP genotipleri arasındaki ilişkiler	102
3.3.3.1	MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	103

3.3.3.2	<i>MIR155</i> rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması	105
3.3.3.3	<i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T SNP'si genotip ve genotip modellerine göre plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması....	108
3.3.4	Demografik ve klinik kategorik parametrelere göre karşılaştırma...	110
3.3.4.1	Naif RRMS grubunda gerçekleştirilen analizler	111
3.3.4.2	Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda gerçekleştirilen analizler	120
3.3.5	Korelasyon analizleri.....	130
3.3.5.1	Naif RRMS hastalarında yapılan korelasyon analizleri	130
3.3.5.2	Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında yapılan korelasyon analizleri	132
3.3.5.3	Kontrol grubunda yapılan korelasyon analizleri	133
3.3.6	Lojistik regresyon analizleri.....	134
3.3.6.1	Naif RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizler ...	136
3.3.6.2	Fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında gerçekleştirilen analizler	137
3.3.6.3	Fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizleri	138
3.3.7	Receiver operating characteristics (ROC) analizleri	139
3.3.7.1	Naif RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizler ...	140
3.3.7.2	Fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında gerçekleştirilen analizler	142
3.3.7.3	Fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizler	145
4.	TARTIşMA	149
4.1	�alışma Gruplarının Demografik ve Klinik Profili.....	151
4.1.1	Grup-1'in demografik ve klinik profili	151
4.1.1.1	Grup-1'in demografik profili	151
4.1.1.2	Grup-1'deki RRMS hastalarının klinik profili	152
4.1.2	Grup-2'nin demografik ve klinik profili	155
4.1.2.1	Grup-2'nin demografik profili	155
4.1.2.2	Grup-2'nin klinik profili.....	156
4.2	miRNA SNP Genotipleri ile RRMS Arasındaki İlişkiler.....	158

4.2.1	<i>MIR146A</i> rs2910164 G/C.....	159
4.2.2	<i>MIR155</i> rs767649 T/A	163
4.2.3	<i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T	166
4.2.4	miRNA SNP'lerinin kombinasyonları	169
4.3	miRNA SNP'leri ile RRMS Hastalarının Klinik Bulgularının Arasındaki İlişkilerin İncelenmesi	169
4.3.1	<i>MIR146A</i> rs2910164 G/C SNP'sinin etkileri.....	169
4.3.2	<i>MIR155</i> rs767649 T/A SNP'sinin etkileri	170
4.3.3	<i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin etkileri	171
4.4	MS Riski, Engellilik Düzeyleri ve MS Progresyonu ile İlişkili Parametreler	171
4.4.1	MS hastalık riski ile ilişkili parametreler	171
4.4.2	Engellilik düzeyleri ile ilişkili parametreler.....	172
4.4.3	MS hastalık progresyonu ile ilişkili parametreler	173
4.5	miRNA Seviyelerinin RRMS ile İlişkileri	175
4.5.1	Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleriyle RRMS arasındaki ilişkiler	175
4.5.1.1	Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS ile ilişkisinin incelenmesi.....	182
4.5.1.2	Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS ile ilişkilerinin incelenmesi	186
4.5.1.3	Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS ile ilişkilerinin incelenmesi	191
4.6	<i>In silico</i> Analizler ve miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin Ortak Hedefleri.....	195
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	201
	KAYNAKLAR	211
	EKLER.....	255



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Normal bir sinir hücresinin ve MS'e bağlı miyelin hasarının olduğu bir sinir hücresinin temsili görünümü.	1
Şekil 1.2: MS Atlası 3. versiyonuna göre Dünya genelinde 100.000 kişi başına görülen MS'li hasta sayısı.	4
Şekil 1.3: MS gelişiminde rol oynayan başlıca çevresel ve genetik risk faktörleri.	5
Şekil 1.4: MS immünopatogenezinin temsili bir özeti.	11
Şekil 1.5: MS'in klinik alt tipleri ve zaman içerisinde hastalık aktivitesinin engelliliğe olan etkisinin temsili gösterimi.	15
Şekil 1.6: EDSS skorlarının derecelendirmesi ve hastaların engellilik durumları.	17
Şekil 1.7: miRNA biyogenezinin temsili şeması.	22
Şekil 1.8: <i>MIR146A</i> geninin lokasyonunun (A), hsa-miR-146a'nın saç tokası yapısının (B) ve olgun hsa-miR-146a-5p'nin dizisinin (C) gösterimleri.	26
Şekil 1.9: miR-146a-5p'nin negatif geri besleme yoluyla NF-κB sinyal yolunu düzenlemesinin temsili gösterimi.	28
Şekil 1.10: <i>MIR155HG</i> geninin lokasyonunun (A), hsa-miR-155'in saç tokası yapısının (B) ve olgun hsa-miR-155-5p'nin dizisinin (C) gösterimleri.	31
Şekil 1.11: <i>MIR1962</i> geninin lokasyonunun (A), hsa-miR-196a2'nin saç tokası yapısının (B) ve olgun hsa-miR-196-5p'nin dizisinin (C) gösterimleri.	34
Şekil 1.12: <i>MIR146A</i> rs29210164 G/C SNP'sinin temsili gösterimi.	38
Şekil 1.13: <i>MIR155</i> rs767649 T/A SNP'sinin temsili gösterimi.	39
Şekil 1.14: <i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin temsili gösterimi.	41
Şekil 2.1: TaqMan problemlerinin çalışma mekanizması.	54
Şekil 2.2: Genotipleme çalışması için RT-PCR cihazında kurulan program.	56
Şekil 2.3: rs2910164 G/C SNP'sine ait RT-PCR sonucunda elde edilen alelik dağılım haritası.	57
Şekil 2.4: rs767649 T/A SNP'sine ait RT-PCR sonucunda elde edilen alelik dağılım haritası.	59
Şekil 2.5: rs11614913 C/T SNP'sine ait RT-PCR sonucunda elde edilen alelik dağılım haritası.	60
Şekil 2.6: qRT-PCR için RT-PCR cihazında kurulan döngü programı.	66

Şekil 2.7: Ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primerlerin erime eğrisi sonuçları (A) ve bu çalışmada elde edilen amplifikasyon eğrileri (B).	67
Şekil 3.1: Tez çalışmasında oluşturulan örnek gruplarının özeti.	71
Şekil 3.2: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri.	100
Şekil 3.3: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri.	101
Şekil 3.4: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri.	102
Şekil 3.5: Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre dağılımı.	105
Şekil 3.6: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre dağılımı.	107
Şekil 3.7: Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre dağılımı.	110
Şekil 3.8: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki naif RRMS (n=30) ve kontrol (n=30) sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin eğrisi.	141
Şekil 3.9: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve naif RRMS hastalarının (n=30) sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin eğrisi.	143
Şekil 3.10 Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve naif RRMS hastalarının (n=30) sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin eğrisi.	144
Şekil 3.11: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin eğrisi.	146
Şekil 4.1: miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin etkileşim ağında bulunan genler.	195

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1: MS tanısı için belirlenen 2017 Revize McDonald kriterleri.....	13
Çizelge 2.1: TaqMan SNP genotipleme kitlerine ait bilgiler.....	50
Çizelge 2.2: TaqMan SNP genotipleme kitlerinin prob dizileri.	50
Çizelge 2.3: Ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primer bilgileri.	51
Çizelge 2.4: RT-PCR reaksiyon içeriği.....	53
Çizelge 2.5: SNP'lerin FAM ve VIC floresan işaretçilerinin temsil ettiği aleller.	54
Çizelge 2.6: Genotipleme çalışması için kurulan reaksiyon döngüsü.....	56
Çizelge 2.7: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği.	64
Çizelge 2.8: Ters transkripsiyon PCR için kurulan reaksiyon programı.	65
Çizelge 2.9: qRT-PCR reaksiyon içeriği.....	66
Çizelge 2.10: qRT-PCR için reaksiyon döngüsü programı.....	66
Çizelge 2.11: AUC değerlerine göre analizin başarı durumu değerlendirmesi	69
Çizelge 3.1: Grup-1 popülasyonundaki RRMS ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet karşılaştırmaları.	72
Çizelge 3.2: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet karşılaştırmaları.....	72
Çizelge 3.3: Grup-1 popülasyonundaki RRMS hastalarının klinik bilgilerinin cinsiyetler arasında karşılaştırmaları.	74
Çizelge 3.4: Grup-1 popülasyonunu oluşturan RRMS ve kontrol gruplarında <i>MIR146A</i> rs2910164 G/C SNP'sinin Hardy-Weinberg uyum analizi.....	75
Çizelge 3.5: Grup-1'de <i>MIR146A</i> rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve alel frekanslarının dağılımı ve RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması.	76
Çizelge 3.6: Grup-1 popülasyonunda <i>MIR146A</i> rs2910164 G/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması.	77
Çizelge 3.7: Grup-1 popülasyonunu oluşturan RRMS ve kontrol gruplarında <i>MIR155</i> rs767649 T/A SNP'sinin Hardy-Weinberg uyum analizi.....	77

Çizelge 3.8: Grup-1'de <i>MIR155</i> rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve alel frekanslarının dağılımı ve RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması.	78
Çizelge 3.9: Grup-1 popülasyonunda <i>MIR155</i> rs767649 T/A SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması.	79
Çizelge 3.10: Grup-1 popülasyonunu oluşturan RRMS ve kontrol gruplarında <i>MIR196A2</i> rs116149143 C/T SNP'sinin Hardy-Weinberg uyumu.	79
Çizelge 3.11: Grup-1'de <i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekanslarının dağılımı ve RRMS ile kontrol grubu karşılaştırılması...	80
Çizelge 3.12: Grup-1 popülasyonunda <i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması.	81
Çizelge 3.13: Grup-1 popülasyonunda kombine SNP genotiplerinin RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırmaları.....	82
Çizelge 3.14: <i>MIR146A</i> rs2910164 G/C SNP'sinin genotiplerine göre Grup-1'deki RRMS'li hastaların klinik bilgileri.	84
Çizelge 3.15: <i>MIR155</i> rs767649 T/A SNP'sinin genotiplerine göre Grup-1'deki RRMS'li hastaların klinik bilgileri.	86
Çizelge 3.16: <i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T SNP'sinin genotiplerine göre Grup-1'deki RRMS'li hastaların klinik bilgileri.	89
Çizelge 3.17: Grup-1'deki RRMS hastalarında (n=400) EDSS ve MSSS ile serum 25-(OH) D ₃ ve lipit paneli düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi.	91
Çizelge 3.18: Grup-1 çalışma popülasyonunda RRMS (n=400) ve Kontrol (n=400) grupları arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan model ve hastalık riski ile ilişkili bulunan parametreler.	93
Çizelge 3.19: Grup-1 çalışma popülasyonundaki RRMS hastalarında (n=400) orta düzey EDSS riski (EDSS>3) için yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkili bulunan parametreler.	94
Çizelge 3.20: Grup-1 çalışma popülasyonundaki RRMS hastalarında (n=400) hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) için yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunan parametreler.	96
Çizelge 3.21: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının klinik bilgileri.....	98
Çizelge 3.22: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri.	100
Çizelge 3.23: miR-146a-5p plazma ekspresyon seviyesinin <i>MIR146A</i> rs2910164 G/C genotiplerine göre Grup-2 popülasyonunu oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında ve grup içi karşılaştırması.	104

Çizelge 3.24: miR-155-5p plazma ekspresyon seviyesinin <i>MIR155</i> rs76749 T/A genotiplerine göre Grup-2 popülasyonunu oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında ve grup içi karşılaştırması.	106
Çizelge 3.25: miR-196a-5p plazma ekspresyon seviyesinin <i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T genotiplerine göre Grup-2 popülasyonunu oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında ve grup içi karşılaştırması.	109
Çizelge 3.26: Grup-2’de naif RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin cinsiyetler arasında karşılaştırma analizi sonuçları.	112
Çizelge 3.27: Grup-2’deki naif RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin sigara kullanım durumuna göre karşılaştırma analizi sonuçları.	113
Çizelge 3.28: Grup-2’deki naif RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin kontrast tutan lezyon varlığına göre karşılaştırma analizi sonuçları... 115	115
Çizelge 3.29: Grup-2’deki naif RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değeri olarak belirlenen sınır değerine göre düşük ve yüksek miRNA ekspresyon seviyelerine sahip bireyler arasında karşılaştırma analizi sonuçları.	116
Çizelge 3.30: Grup-2’deki naif RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılan EDSS ve MSSS değerleri arasında karşılaştırma analizi sonuçları.....	118
Çizelge 3.31: Grup-2’deki naif RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin orta düzey EDSS (EDSS>3) riskine sahip olan, olmayan ve hızlı MS progresyon (MSSS>5) riskine sahip olan, olmayan hastalar arasında karşılaştırma analizi sonuçları.	119
Çizelge 3.32: Grup-2’deki fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin cinsiyetler arasında karşılaştırma analizi sonuçları.....	121
Çizelge 3.33: Grup-2’deki fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin sigara içme durumuna göre karşılaştırma analizi sonuçları.....	123
Çizelge 3.34: Grup-2’deki fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin kontrast tutan lezyon varlığına göre karşılaştırma analizi sonuçları.	124
Çizelge 3.35: Grup-2’deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değerine göre belirlenen sınır değerine göre düşük ve yüksek miRNA ekspresyon seviyeleri arasında karşılaştırma analizi sonuçları.	126
Çizelge 3.36: Grup-2’deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılan EDSS ve MSSS düzeyleri arasında karşılaştırma analizi sonuçları.	128

Çizelge 3.37: Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin orta düzey EDSS (EDSS>3) riskine sahip olan, olmayan ve hızlı MS progresyon riskine sahip (MSSS>5) olan, olmayan hastalar arasında karşılaştırma analizi sonuçları.	129
Çizelge 3.38: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS grubunda (n=30) gerçekleştirilen korelasyon analizi sonuçları.	131
Çizelge 3.39: Grup-2 popülasyonundaki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda (n=29) gerçekleştirilen korelasyon analizleri sonuçları.	133
Çizelge 3.40: Grup-2 popülasyonundaki kontrol grubunda (n=30) gerçekleştirilen korelasyon analizleri sonuçları.	134
Çizelge 3.41: Grup-2 çalışma popülasyonunda naif RRMS hastaları (n=30) ve kontrol grubu (n=30) arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan model ve hastalık riski ile ilişkili bulunan parametreler.	136
Çizelge 3.42: Grup-2 çalışma popülasyonunda bulunan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları (n=29) ve naif RRMS hastaları (n=30) arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve fingolimod tedavisi alma durumuyla ilişkili bulunan parametreler.	138
Çizelge 3.43: Grup-2 çalışma popülasyonunda bulunan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları (n=29) ve kontrol grubu (n=30) arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve fingolimod tedavisi alan RRMS olma durumuyla ilişkili bulunan parametreler... ..	139
Çizelge 3.44: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS ve kontrol grupları arasındaki hata matrisi.	141
Çizelge 3.45: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasındaki hata matrisi.	143
Çizelge 3.46: Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasındaki hata matrisi.	145
Çizelge 3.47: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasındaki hata matrisi.	147
Çizelge 3.48: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının ikili olarak karşılaştırıldıklarında grupların sınıflandırılmaları ile ilişkili parametrelerin belirlenmesi için yapılan ROC analizlerinden istatistiksel olarak anlamlı bulunanlar.	148
Çizelge 4.1: Farklı hastalıklarda ve popülasyonlarda rs2910164 G/C SNP'sinin C alel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımı.	161
Çizelge 4.2: Farklı hastalıklarda ve popülasyonlarda rs767649 T/A SNP'sinin A alel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımı.	165
Çizelge 4.3: Farklı hastalıklarda ve popülasyonlarda rs11614913 C/T SNP'sinin T alel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımı.	167
Çizelge 4.4 Serum/plazma numunelerinde RRMS ile ilişkili miRNA'lar.	176
Çizelge 4.5: RRMS hastalarında serum veya plazmada ekspresyon seviyesi değişen miRNA'ların MS'te muhtemel biyolojik işlevleri.	178

KISALTMALAR

25-(OH) D3	: 25-Hidroksivitamin D3
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AGL	: Amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase
AIC	: Akaike information criterion
ANXA-1	: Annexin-A1
AUC	: Area under the curve
Aβ	: Amyloid beta
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor
BIC	: Bayesian information criterion
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
BTG1	: B-cell translocation gene 1
C/EBPβ	: CCAAT-enhancer binding protein-beta
CCL2	: C motif chemokine ligand 2
CCND1	: Cyclin D1
cDNA	: Complementary DNA
CI	: Confidence interval
CTLA4	: Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DGCR8	: DiGeorge syndrome critical region 8
DMT	: Disease modifying therapy
DN	: Doğru negatif
DP	: Doğru pozitif
DSS	: Disability status scale
EAE	: Experimental autoimmune encephalomyelitis
EBV	: Epstein Barr Virüs
EDN1	: Endothelin-1
EDSS	: Expanded disability status scale
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuzu
EGCG	: Epigallocatechin-3-gallate
FDA	: Food and Drug Administration
FGF2	: Fibroblast growth factor-2
FOX	: Forkhead box
gMAF	: Global minor allele frequency
HDL	: High density lipoprotein
HG	: Host gene
HLA	: Human leukocyte antigen
HMGA	: High mobility group A
HOX	: Homeobox
HSP90	: Heat shock protein 90
IFN	: Interferon
IgG	: Immünoglobulin G
IKKϵ	: Inhibitor of nuclear factor κ -B kinase ϵ

IκB	: Inhibitor κB
IL	: Interlökin
IMSGC	: International Multiple Sclerosis Genetics Consortium
IRAK1	: Interleukin 1 receptor associated kinase 1
IRF3	: Interferon regulatory factor 3
IRS1	: Insulin receptor substrate 1
JAK2	: Janus kinase 2
JUN	: AP-1 transcription factor subunit
KBB	: Kan beyin bariyeri
KİS	: Klinik izole sendrom
LDL	: Low density lipoprotein
LNFG	: Lunatic fringe
LPS	: Lipopolisakkarit
MAPK8	: Mitogen-activated protein kinase 8
MBP	: Miyelin bazik protein
MEF2A	: Myocyte enhancer factor 2A
MIF	: Macrophage migration inhibitory factor
miRNA	: MikroRNA
MMP2	: Matrix metalloproteinase 2
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MS	: Multipl Skleroz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MUT	: Methylmalonyl-CoA mutase
MYD88	: Myeloid differentiation primary response 88
NCAM	: Neural cell adhesion molecule
NF-κB	: Nükleer faktör-κB
NFKBIA	: NFKB inhibitor alpha
NOTCH2	: Notch receptor 2
NR6A1	: Nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1
NTC	: Negative template control
Nurr1	: Nuclear receptor related 1 protein
OKB	: Oligoklonal bant
OPC	: Oligodendrocyte progenitor cell
OR	: Odds ratio
PA	: Psoriatik artrit
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cells
PCCA	: Propionyl-CoA carboxylase subunit alpha
PCCB	: Propionyl-CoA carboxylase subunit beta
PDK1	: Phosphoinositide-dependent kinase-1
PEG	: Psödoeksfolyatif glokom
PELI1	: Pellino E3 ubiquitin protein ligase 1
PEX	: Psödoeksfolyasyon sendrom
PIK3R2	: Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2
PLS	: Partial least squares
PPMS	: Primer progresif MS
PPP1R11	: Protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 11
PRKAR1A	: Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha
PTGS2	: Prostaglandin-endoperoxide synthase 2

qRT-PCR	: Quantitative real time PCR
RA	: Romatoid Artrit
RIPK1	: Receptor interacting protein kinase 1
RISC	: RNA-induced silencing complex
ROC	: Reciever operating characteristics
RRMS	: Relapsing remitting MS
RT-PCR	: Real time polymerase chain reaction
S1P	: Sfingozin-1-fosfat
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SEC23IP	: SEC23 interacting protein
SEMA3A	: Semaphorin 3A
SFMBT1	: Scm like with four mbt domains 1
SHIP1	: Src homology domain 2-containing inositol 5-phosphatases 1
SIN3	: SIN3 transcription regulator family member A
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
SMAD4	: Mothers against decapentaplegic homolog 4
SNP	: Single nucleotide polymorphism
SOCS1	: Supressor of cytokine signaling protein 1
SPMS	: Sekonder progresif MS
SQSTM1	: Sequestosome 1
STAT3	: Signal transducer and activator of transcription 3
STAT5A	: Signal transducer and activator of transcription 5A
STIM1	: Stromal interaction molecule 1
TBK1	: TANK binding kinase 1
TGFB1	: Transforming growth factor beta 1
Th	: T helper
TIMP2	: Tissue inhibitor of metalloproteinases 2
TLR	: Toll like receptor
TM	: Teknoloji Merkezi
TNF	: Tumor necrosis factor
TOBB ETÜ	: Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
TRAF-6	: TNF receptor associated factor 6
Treg	: Regulatory T cell
UTR	: Kodlanmayan bölge
UVB	: Ultraviyole B ışını
VIF	: Variance inflation factor
VLDL	: Very low density lipoprotein
YN	: Yanlış negatif
YP	: Yanlış pozitif
ZFP36	: Zinc finger protein 36
ZNF652	: Zinc finger protein 652



SEMBOL LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

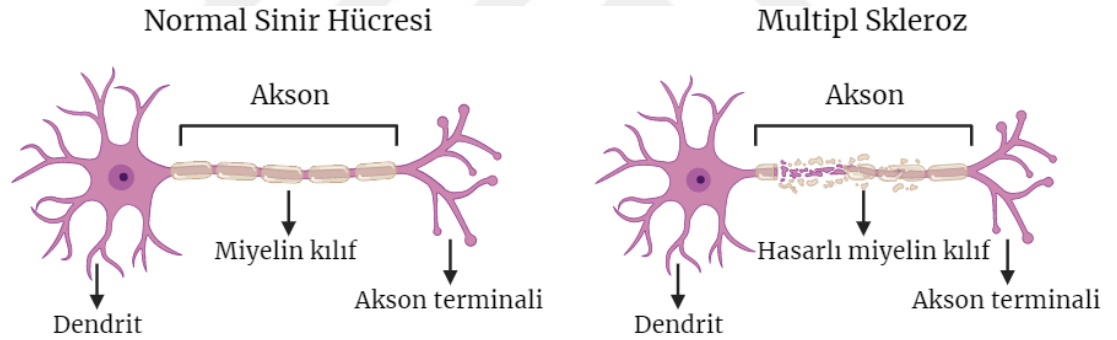
A	Alfa 1
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$\Delta\Delta\text{Ct}$	Delta delta Ct
γ	Gama
κ	Kappa
%	Yüzde
nM	Nanomolar
mM	Milimolar
g	Gram
ng	Nanogram
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
kb	Kilobaz
bç	Baz çifti
U	Unit
V	Vol
χ^2	Ki-kare
<	Küçüktür
>	Büyüktür
$\geq$	Büyük eşittir
$\leq$	Küçük eşittir
$\approx$	Yaklaşık
=	Eşittir
+	Artı
$\pm$	Artı-eksi



1. GİRİŞ

1.1 Multipl Skleroz

Multipl Skleroz (MS), genç yetişkinlerde travma harici nörolojik engelliliğin en yaygın sebebi olan; kronik enflamatuvar, otoimmün, nörodejeneratif, demiyelinizan bir merkezi sinir sistemi (MSS) hastalığıdır (Dobson & Giovannoni, 2019; Efendi & Yandım Kuşçu, 2018). Kendiliğinden reaktif olan (otoreaktif) bağışıklık sistemi hücrelerinin, MSS’de yer alan nöronları saran miyelin kılıflara saldırımlarıyla tahribata neden olarak (Şekil 1.1), beyin ve omuriliğin beyaz ve gri maddesinde oluşturdukları demiyelinizan lezyonların birikmesi hastalığın karakteristik patolojik özelliğidir (Filippi vd., 2018).



Şekil 1.1: Normal bir sinir hücresinin ve MS’e bağlı miyelin hasarının oluştuğu bir sinir hücresinin temsili görünümü (Filippi vd., 2018).

Biriken demiyelinizasyonun yanı sıra demiyelinize aksonlarda mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun ve enflamasyonun zayıflatığı enerji metabolizmasının da nörodejenerasyona sebep olduğu düşünülmektedir (Thompson vd., 2018). Beyin ve omurilikte meydana gelen bu hasarlar, nörolojik engellilik düzeyini artırır. Hastalarda yorgunluk ve kuvvetsizliğin yanı sıra duyu kaybı, uzuv zayıflığı, mesanede fonksiyon bozukluğu, koordinasyon ve bellek kaybı gibi semptomlar izlenebilir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Reich vd., 2018). MS hastalığının, hastaların sosyoekonomik durumları ve işlev gösterme becerileri üzerindeki etkileri, bireylerin gündelik yaşamını sekteye uğratabilecek ciddi sorunları açığa çıkarır (Dobson & Giovannoni, 2019).

MS, hastalar arasında farklı klinik belirtilerin ve hastalık seyirlerinin görülebildiği heterojen bir hastalıktır. MSS'nin bir bölgesinde demiyelinizasyon veya enflamasyonla ilişkili, tek bir nörolojik atakla karakterize olan ve MS şüphesi uyandıran klinik izole sendrom (KİS), hastalığın başlangıç evresi olarak görülmektedir. Ataklarla seyreden MS (Relapsing remitting MS – RRMS), yeni semptomların ortaya çıktığı veya mevcut semptomların kötüleştiği atak dönemlerinin (relapsing) genellikle birkaç gün ile birkaç hafta sürdüğü ve iyileşme dönemlerinde (remitting) kısmi veya tama yakın düzelmelerin görüldüğü en yaygın klinik alt formudur. RRMS tanılı hastalarda atak sıklığının artmasıyla ve hastalığın seyri sırasında kalıcı nörolojik kusurların gelişip engellilik düzeyinin ilerlemesiyle ikincil ilerleyici MS (Secondary progressive MS – SPMS) alt formu gözlemlenmektedir. Hastalığın başlangıçtan beri kötüleştiği klinik alt form da birincil ilerleyici MS (Primary progressive MS – PPMS) olarak bilinmektedir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Thompson vd., 2018).

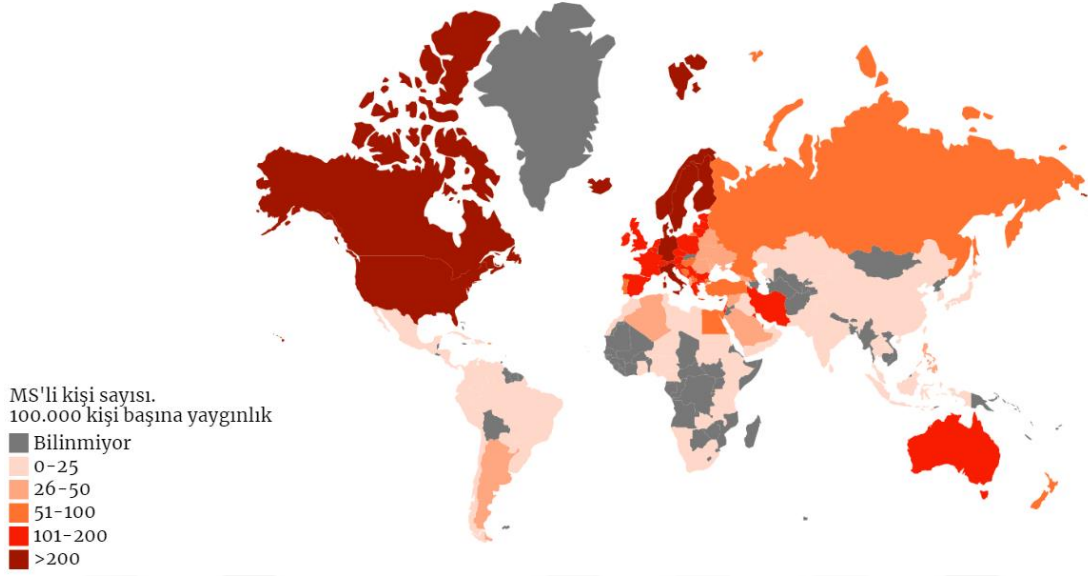
MS'in altında yatan neden tam olarak bilinmemekle beraber, MS hastalığı kompleks genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin etkileşimlerinin neden olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır (Filippi vd., 2018). D vitamini eksikliği, ultraviyole B ışık (UVB) maruziyet eksikliği, Epstein-Barr virüsü (EBV) enfeksiyonu, obezite, sigara kullanımı ve coğrafi etkenler gibi çevresel faktörlerle birlikte genetik yatkınlık, cinsiyet, etnik köken gibi genetik bazı faktörler de hastalığa duyarlılığı artırmaktadır (Dobson & Giovannoni, 2019).

MS'e yatkınlığa işaret edebilecek güncel ve umut vadeden potansiyel risk faktörleri bulunmasına rağmen, hastalığın kompleks etiyolojisi, patogenezi ve bağışıklık sisteminin karışıklığı, yeni yapılacak çalışmalara olan ihtiyacı doğurmaktadır (Yadav vd., 2015). Ölümcül olmayan bu hastalık tam olarak anlaşılamayan heterojen yapısı ve hastaların hayat kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerinin daha çok genç yetişkinlerde görülmesi sebebiyle dünya çapında kayda değer bir oranda işgücü kaybına neden olabilmektedir. MS'in sebep olduğu bu sosyoekonomik zarar, pediatrik vakaların ve hamilelerin de tedaviye ihtiyaç duyması; bu hastalığın toplumun büyük bir kesimine etki ettiğinin ve bugün halen araştırılmaya değer olduğunun bir göstergesidir (Loma & Heyman, 2011).

1.1.1 Multipl Sklerozun epidemiyolojisi

MS özellikle genç yetişkinlerde görülen ve insidansı dünya çapında artan nörolojik bir hastalıktır (Dobson & Giovannoni, 2019). MS'in görülme sıklığı 1990 yılından bu yana küresel ölçekte önemli ölçüde artmıştır (Wallin vd., 2019). MS Atlasına göre, dünyadaki MS'li hasta sayısı 2013 yılında 2.3 milyon iken 2020 yılında %30 oranında artarak 2.8 milyona yükselmiştir (MSIF, 2020). Hastalığın küresel yaygınlığı 100.000 kişi başına 35.9 olarak belirlenmiştir. 2013 yılından 2020 yılına kadar verilerin sağlıklı bir şekilde toplanabildiği ülkeler arasından sadece %14'ü sabit veya azalan bir görülme sıklığı bildirmiştir (Walton vd., 2020). Artan yaygınlık oranının ekonomik yükünün 2010'da Avrupa'da yaklaşık olarak 14.6 milyar Euro, 2013 yılında ise Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 4.3 milyar Dolar olduğu tahmin edilmektedir (Filippi vd., 2018).

MS'in görülme sıklığı toplumlar arasında farklılık göstermektedir (Şekil 1.2). Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya kıtası MS görülme sıklığının en yüksek olduğu yerler (>100/100.000); Asya, Uzak Doğu ve Afrika ise en düşük olduğu yerler ($\leq 5/100.000$) olarak gözlemlenmektedir. Avrupa bölgesinde San Marino (337/100.000), Danimarka (301/100.000) ve Almanya (300/100.000) dünya genelinde en yüksek yaygınlığa sahip ülkelerken, bu ülkeleri Kanada (290/100.000) ve ABD (288/100.000) izlemektedir (MSIF, 2020; Walton vd., 2020). Ülkemizde MS görülme sıklığı, Türkiye'nin Asya ve Avrupa kıtaları arasında geçiş bölgesi olmasından dolayı farklı bölgeler arasında değişiklik göstermektedir. Edirne bölgesinde yapılan bir çalışmada MS'in görülme sıklığı (34/100.000), komşusu olan Bulgaristan (40/100.000) ve Yunanistan (39/100.000) gibi Balkan ülkeleri ile benzerlik gösterirken, Avrupa ülkelerine göre daha düşüktür (Çelik vd., 2011). Börü ve arkadaşlarının çalışmalarında ise, İstanbul bölgesinde (102/100.000) ve Batı Karadeniz bölgesinde (96/100.000) MS görülme sıklığının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Börü vd., 2006, 2018). Orta Karadeniz bölgesinde (43/100.000) ve ülkemizin kırsal bölgelerinde ise (48/100.000) MS yaygınlığı benzerlik gösterirken, Sivas bölgesinde (288/100.000) bir hayli yüksek olduğu tespit edilmiştir (Akdemir vd., 2017; Bölük vd., 2021; Gökçe vd., 2019). Coğrafi ve çevresel farklılıkların bölgesel etkileri bu çalışmalar ile gösterilirken, MS Atlasının verilerine göre Türkiye'de MS hastalığının görülme sıklığı 100.000 kişi başına 70 olarak bildirilmiştir (MSIF, 2020).



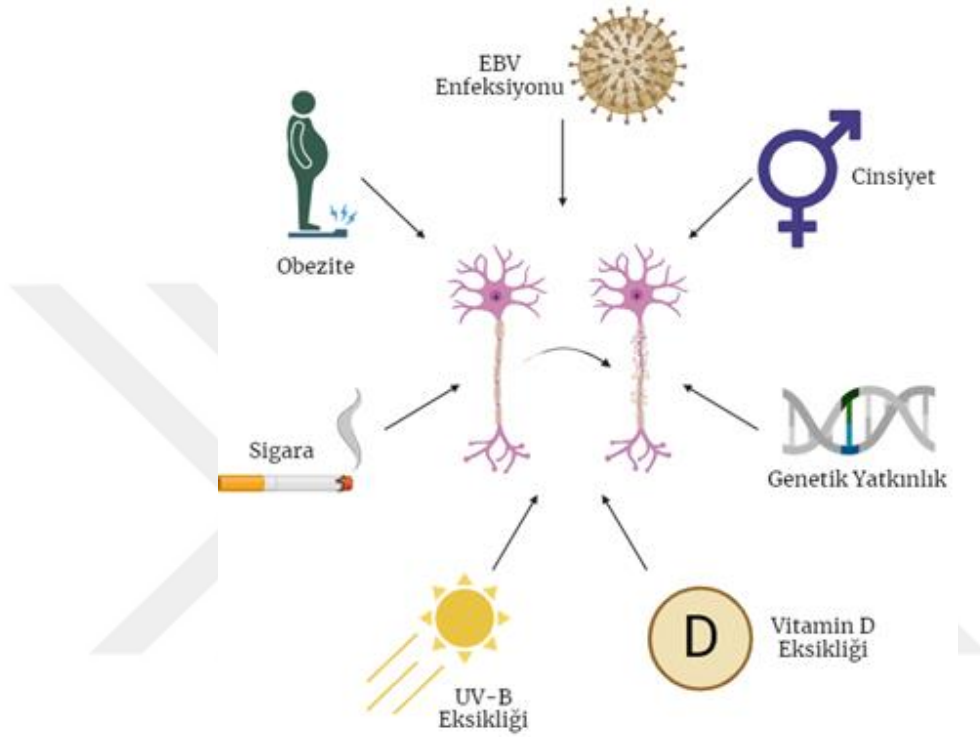
Şekil 1.2: MS Atlası 3. versiyonuna göre Dünya genelinde 100.000 kişi başına görülen MS'li hasta sayısı (MSIF, 2020).

MS hastalığının görülme sıklığı toplumlar ve bölgeler arasında farklılık gösterdiği gibi cinsiyetler arasında da değişiklik göstermektedir. Dünya geneline bakıldığında zaman zaman MS hastalığının kadınlarda erkeklere göre daha yaygın olduğu gösterilmiştir. 1900'lerin başında bu durumun böyle olmadığı görülse de İkinci Dünya Savaşı'ndan sonra kadınlar arasında sigara kullanımının artmasıyla birlikte MS'in yaygınlığının da kadınlarda arttığı düşünülmektedir. 1950'lerden bu yana artmaya devam eden kadın-erkek oranı birçok gelişmiş ülkede 3:1 iken (Dobson & Giovannoni, 2019); Türkiye genelinde özel olarak cinsiyet oranı üzerinde gerçekleştirilen bir araştırma bulunmamakla birlikte Trakya bölgesinde kadın-erkek oranı 2.55:1 olarak bulunmuştur (Çelik vd., 2011).

Çoğunlukla genç erişkinlerde görülse de son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarda MS'in çocukluk dönemlerinde de ortaya çıkabildiği gösterilmiştir. ABD'de her sene yeni MS tanısı alan hastaların yaklaşık %5'ini pediatrik vakalar oluştururken, Dünya genelinde 2013 yılında 7.000'den fazla 18 yaş altı MS'li hasta bildirilmiştir (Loma & Heyman, 2011; Walton vd., 2020). Yapılan araştırmalardan MS hastalığının endemik bir hedef kitlesinin ve özel bir yaş aralığının olmadığı, her toplumdaki her bir bireyi hayatının herhangi bir zamanında tehdit edebildiği görülmektedir.

1.1.2 Multipl Sklerozun etiyolojisi

MS'in genetik, epigenetik ve çevresel faktörlerin kombinasyonunu içeren karmaşık bir etiyolojisi vardır (Filippi vd., 2018; Wallin vd., 2019). Hastalığın kesin nedeni belirsizliğini korurken, öne çıkan birkaç risk faktörü tanımlanmış ve bunlar sonraki bölümlerde ayrıntıları ile açıklanmıştır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: MS gelişiminde rol oynayan başlıca çevresel ve genetik risk faktörleri (Filippi vd., 2018).

1.1.2.1 Çevresel faktörler

Yaşam tarzı ve çevresel faktörler geniş bir yelpazede incelenmektedir ve MS riskini güçlü bir şekilde etkilemektedir. Bireylerin çocukluk ve yetişkinlik dönemlerinde maruz kaldıkları, bulundukları coğrafyayla ve yaşam tarzıyla maruziyet derecesi değişen çevresel etkenler, adaptif ve doğal bağışıklığı etkileyebilir. Çevresel faktörlerin rolünün daha iyi anlaşılması, özellikle MS'li bireylerin akrabaları gibi daha yüksek risk altındaki kişiler için hastalığın seyrinin değiştirilebilmesine hatta hastalığın ortaya çıkışının önlenmesine olanak sağlayabilir (Alfredsson & Olsson, 2019; Ghasemi vd., 2016; Olsson vd., 2016).

Farklı epidemiyolojik çalışmalarda enlem etkisinin MS hastalığında ayırıcı bir rolü olduğu görülmüştür (Becklund vd., 2010; Rana vd., 2011). Enlem etkisinin altında yatan faktör güneş ışığı maruziyeti ve D vitamini düzeyi ile açıklanabilir. D vitamininin aktif metabolitine dönüştürülmesi UVB'ye bağlıdır. Artan enlemlerde azalan güneş ışını açısı, absorbe edilen UVB'nin miktarını ve kalitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Azalan UVB maruziyeti artan MS riski ve hastalık aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir (Filippi vd., 2018). Her ne kadar UVB maruziyetinin etkilerini D vitamininin etkilerinden ayırt etmek zor olsa da MS'in hayvan modeli olan deneysel otoimmün ensefalomyelit (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis – EAE) ile gerçekleştirilen çalışmalarda UVB maruziyetinin D vitamininden bağımsız olarak nöroenflamasyona karşı koruma sağladığı ve düzenleyici T hücre (Treg) aktivasyonu ile enflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Becklund vd., 2010; Rana vd., 2011). D vitamininin aktif formunun immün sistem hücrelerinin farklılaşması ve immün yanıtların düzenlenmesinde aktif olarak rol aldığı bilinmesi ve yetişkin MS hastalarının D vitamini seviyelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olması düşük D vitamini seviyesinin bir risk faktörü olduğunu desteklemektedir (Filippi vd., 2018; Sintzel vd., 2018; Yadav vd., 2015).

Zararlı etkileri birçok hastalığın gelişiminde rol oynayan sigara kullanımının MS geliştirme riskini yaklaşık 1.6 kat artırdığı gösterilmiştir (Handel vd., 2011). Sigaranın düzenli ve yüksek dozda kullanımı artan MS riskiyle beraber, MS'e bağlı engelliliğin ilerlemesiyle de ilişkilidir (Filippi vd., 2018). Sigara dumanında bulunan nitrik oksit patolojik konsantrasyonlarda mitokondriyal hasar ile aksonal dejenerasyona ve demiyelinizasyona neden olduğu bilinmektedir. Nitrik oksit gibi toksik bir gaz olan karbonmonoksitin de miyelin bazik protein (Myelin basic protein – MBP) bozunmasına ve aksonal hasara yol açarak demiyelinizasyonla sonuçlanan enflamasyona sebep olduğu bilinmektedir (Ghasemi vd., 2016). Oluşturduğu hasarın yanı sıra MS tedavisinde kullanılan ajanlara karşı nötralize edici antikör gelişimi riskini artırması da sigara kullanımının MS'te önde gelen risk faktörleri arasında görülmesine neden olmaktadır (Alfredsson & Olsson, 2019). Diğer risk faktörlerinden farklı olarak her yaşta sigara kullanımının yaygınlığı, sigara kullanımının yaşam boyu bir risk faktörü olarak değerlendirilmesine sebep olmaktadır; fakat sigara da D vitamini gibi hastalığın etiyolojisini tek başına açıklayamamaktadır (Filippi vd., 2018).

Ergenlik ve daha sonrasında klinik olarak obezite teşhisi almış olmanın da MS riskini artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Hedström vd., 2016; Munger vd., 2013; Schreiner & Genes, 2021). Özellikle kadınlarda ergenlik dönemi obezitesinin MS riskini artırdığı görülmüştür (Munger vd., 2013). Ayrıca cinsiyetten bağımsız olarak ergenlik dönemi obezitesinin, çocukluk dönemi obezitesine göre yetişkin MS riski geliştirmede daha kritik olduğu gösterilmiştir (Hedström vd., 2016). MS için önde gelen risk faktörlerinden biri olan obezitenin, 2000'lerden sonra küresel bir hastalık halini almış olması, epidemiyolojik olarak dünya çapında kadınlar arasında artan MS yaygınlığının da önemli açıklayıcılarından biri olarak görülmesine neden olmuştur (Olsson vd., 2016). Aslında obezite ve MS arasında bir ilişki kurulabilmiş olsa da obezitenin neden olduğu bu durumun altında yatan mekanizma net bir şekilde bugün hala ortaya konulamamıştır. Artan yağ dokusunun düşük dereceli enflamasyonla karakterize oluşu, obezite varlığında leptin hormonu düzeylerindeki artış, D vitamini biyoyararlanımının ve EBV'ye karşı oluşan bağışıklık tepkisinin azalması gibi teoriler sunulsa da obezite ve MS arasındaki patofizyolojik ilişkilerin daha fazla araştırılması gereken yönleri bulunmaktadır (Alfredsson & Olsson, 2019; Schreiner & Genes, 2021).

Birçok enfeksiyöz ajanın MS geliştirme riski üzerinde etkisi olduğu düşünülse de literatürde kendisine en çok yer bulan EBV'nin nedensel rolü halen araştırılmaya devam etmektedir (Alfredsson & Olsson, 2019). 2010 yılında Handel ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada klinik olarak EBV enfeksiyonu geçiren kişilerde MS hastalığı riskinin iki kattan daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Handel vd., 2010). MS'li bireylerin EBV nükleer antijen-1'e karşı daha yüksek antikör seviyelerine sahip olması ve MSS lenfödemlerinde EBV ile ilişkili RNA'ların tespiti, virüsün MSS'de otoimmün bir tepkiye veya ikincil bir bağışıklık yanıtına neden olduğunu düşündürmektedir (Olsson vd., 2016). *In vivo* olarak MS'in bir hayvan modeli olan EAE'li farelerde gerçekleştirilen bir çalışmada EBV enfeksiyonu ile MS arasında patolojik bir bağlantı olduğu ve EBV nükleer antijen 1 aşılmasının farelerde hastalığı şiddetlendirdiği gösterilmiştir (Lanz vd., 2022). Ayrıca, 1993 yılında başlatılan 20 yıllık bir boylamsal çalışmanın sonucunda, EBV enfeksiyonun MS riskini 32 kat artırdığı ve EBV'nin MS'in önde gelen nedenlerinden bir tanesi olduğu ortaya çıkartılmıştır (Bjornevik vd., 2022).

1.1.2.2 Genetik faktörler

Aile içinde genler arasında benzerlik oranı yüksektir ve MS'li bireylerin ailelerinde akrabalık derecesi arttıkça MS görülme sıklığı artmaktadır. Bu da MS gelişiminde genetik yatkınlığın ve genetik faktörlerin önemli bir rolü olduğunu göstergesidir. Örneğin, üçüncü derece akrabalarda risk %1'in altındayken, bu oran kardeşlerde %3, çift yumurta ikizlerinde %6'dır. Öyle ki MS hastası bir bireyin tek yumurta ikizinde MS görülme riski %35 gibi bir hayli yüksek bir orana sahiptir (Filippi vd., 2018; Ghasemi vd., 2016; Thompson vd., 2018). MS'in kalıtımında birçok genin rolü olduğu düşünülmektedir. Genom çapında ilişkili genlerin incelendiği çalışmalarda 200'ün üzerinde gen varyantının hastalık riski üzerinde etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Bu gen varyantlarının bireylerde farklı kombinasyonlarının bulunması genetik yatkınlığa farklı oranlarda katkı sağlamaktadır. Ortaya konulan bu varyantların birçoğu bağışıklık sisteminde yer alan molekülleri kodlamakta olup, bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde görülen bozukluklarla ilişkilidir (Filippi vd., 2018). Çoğu otoimmün hastalıkta rolü olan, 6. kromozomun insan lökosit antijen (Human Leukocyte Antigen – HLA) gen bölgesi en yüksek MS riskiyle ilişkilendirilmiştir. *HLA* lokusu üzerinde bulunan alel farklılığının MS'e yatkınlığın %20-30'unu oluşturduğu düşünülmektedir (Ghasemi vd., 2016). *HLA-DRB1*15:01* aleli taşıyıcılarının MS riskinin, taşıyıcı olmayanlara göre 3 kat, homozigot bireylerde ise 6 kat daha fazla olduğu görülmüştür (Dobson & Giovannoni, 2019; Thompson vd., 2018). *HLA* lokusu ile ilişkili olmayan, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunda ve bağışıklık yanıtının oluşturulmasında görev alan interlökin-2 (IL-2) ve IL-7 reseptör alfa genleri de MS'e yatkınlıkta rolü olan gen bölgeleri olarak tanımlanmıştır (Patsopoulos, 2018).

Belirli gen bölgeleri MS ile ilişkilendirilse de hem etki mekanizmaları hem de çevresel faktörlerle olan etkileşimlerinin hastalığın erken dönemlerinde MSS gelişiminde nasıl bir rol oynadığı kesin olarak açıklanamamıştır. Genetik yatkınlığa ve hastalığın seyrine olan etkilerinin anlaşılabilmesi ve MS'in tedavi ve takibinin kişiselleştirilebilmesi için bireysel farklılıkların değerlendirilmesine olan gereklilik, gelecek çalışmalara olan ihtiyacın açıklayıcısı niteliğindedir (Filippi vd., 2018; Thompson vd., 2018).

1.1.3 Multipl Sklerozun patolojisi ve immünopatogenezi

MS'in özgün patolojik tanımı, beyinde, beyin sapında ve omurilikte olmak üzere, tüm MSS'de izlenebilen, demiyelinizasyon ve enflamasyonla karakterize, plak benzeri lezyonların görülmesidir (Dobson & Giovannoni, 2019; Filippi vd., 2018). Klinikte bu lezyonların mekânda ve zamanda yayılımının tespiti manyetik rezonans görüntüleme (MRG) gibi modern tekniklerle mümkün olsa da beyaz ve gri maddede patolojik olarak sertleşmeye ve yara görünümüne sebep olan plakların tüm MSS'ye yayıldığı yaklaşık 150 yıldır bilinmektedir (Reich vd., 2018).

MS lezyonları hastalığın erken evrelerinde heterojen bir görüntü oluşturmaktadır. En kolay beyaz cevherde görülebilen demiyelinizan lezyonlar, özellikle MS şüphesi uyandıran KİS'li ve RRMS'li hastalarda aksonların korunduğu, makrofajları ve lenfositleri içeren, oligodendrosit hasarının görüldüğü aktif lezyonlardır. MRG'den ve patolojik incelemelerden elde edilen kanıtlar bu plakların aylar boyunca geliştiğini ve aktif kaldığını göstermektedir. Hastalığın daha progresif seyre sahip tiplerinde ise enflamasyon sıklığının azalması nedeniyle aktif plaklar daha az görülmektedir. Bu hastaların beyaz cevherlerinde keskin sınırları olan, aktif lezyonlardan daha düşük lenfosit yoğunluğuna sahip aktif olmayan plaklar daha sık görülmektedir. Demiyelinizan plaklar aynı zamanda gri cevherde de görülebilir. Genellikle beyincikte ve korteksteki demiyelinizasyonla karakterize gri madde lezyonları beyaz madde lezyonlarına göre daha az enflamatuardır. Buna ek olarak omurilikte, beyne göre gri madde lezyonları beyaz madde lezyonlarından daha yaygındır. Bu durumun beyin omurilik sıvısında (BOS) bulunan ve demiyelinazasyonu teşvik eden proenflamatuvar faktörlerin varlığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Lezyonların yerleşim yeri ve miktarı sinaps ve nöron yoğunluğunu etkilemekte, hastalığın tanısında ve takibinde önem arz etmektedir (Filippi vd., 2018; Reich vd., 2018).

Demiyelinizasyondan kaynaklı plakların varlığı gibi remiyelinizasyon ile karakterize gölge plaklar da MS'te görülebilmektedir. Remiyelinizasyon, özellikle ataklarla seyreden RRMS formu için atak dönemlerinden sonra görülen klinik bir iyileşme mekanizması olarak tanımlanmıştır. Remiyelinizan gölge plaklar ince miyelin kılıflar, uzamamış aksonlar içerir ve çevresinden keskin bir sınırla izoledir. Hastanın yaşı, hastalık süresi, oligodendrosit öncül hücrelerin (Oligodendrocyte progenitor cell – OPC) varlığı, demiyelinizasyonun boyutu ve MS'in klinik alt tipleri

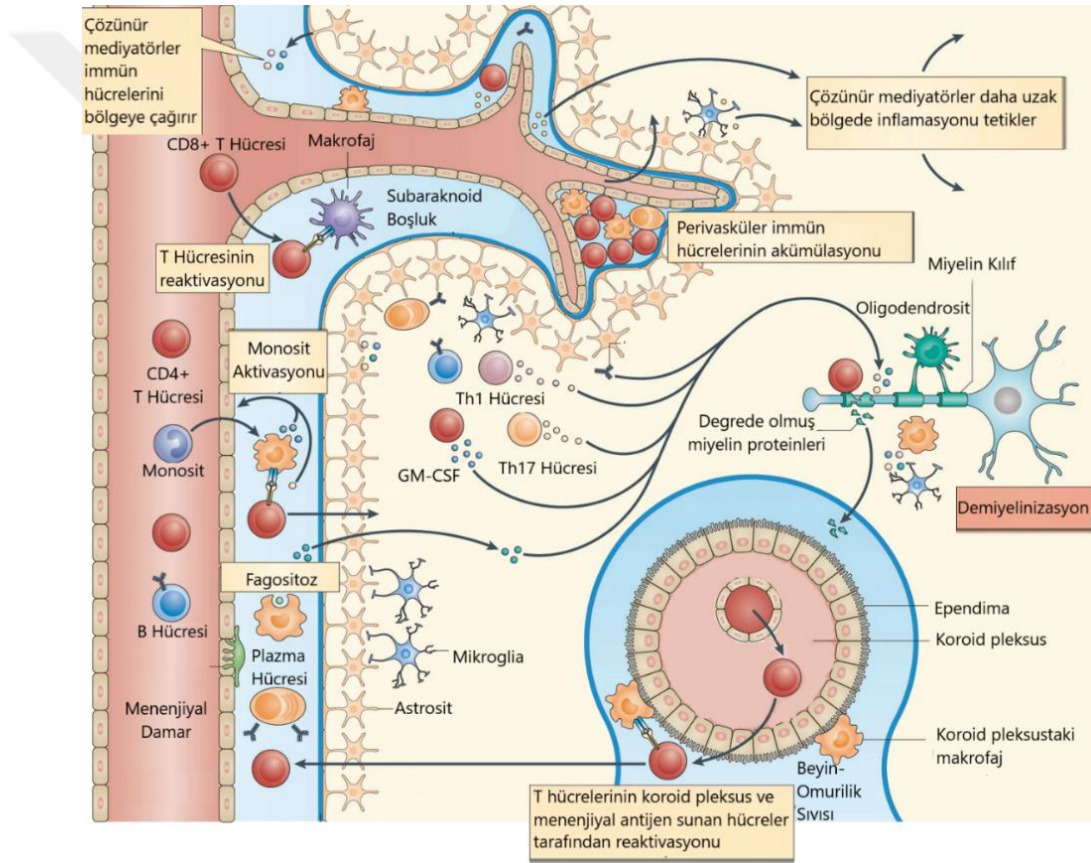
remiyelinizasyonda bireyler arası farklılığın görülmesinin temel sebepleridir. MS'in erken aşamalarında ve genellikle genç bireylerde görülen remiyelinizasyon, progresif hastalık seyrine sahip hastalarda neredeyse hiç yoktur (Filippi vd., 2018).

MS'te görülen tüm bu patolojik değişikliklere neden olan mekanizmaların anlaşılması için yapılmış birçok çalışma mevcuttur ancak MS gelişiminin nasıl başladığına ve otoimmün yanıtlarla nöroenflamasyonun arasındaki ilişkiye dair farklı yorumlar bulunmaktadır. Nöroenflamasyonun nörodejenerasyona yanıt olarak görüldüğünü öne süren görüşler bugün hala araştırılmakta olsa da MS hastalığında nöroenflamatuvar yanıtların otoimmün süreçlerin sonucunda ortaya çıktığı bilinmektedir (Yadav vd., 2015). MS patogenezinin ayırt edici bir özelliği olan enflamasyon, hastalığın erken aşamalarından itibaren tüm evrelerinde ve tüm klinik alt tiplerinde demiyelinizasyon ve nörodejenerasyon ile ilişkilidir. Nöroenflamasyon T hücrelerinin, B hücrelerinin ve miyeloid hücrelerin MSS'ye girişiyle ilişkilendirilmektedir (Reich vd., 2018).

MS'te görülen birincil otoimmün yanıtın ilk olarak T hücrelerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle otoreaktif CD4+ T yardımcı lenfositlerinin tip-1 (Th1) ve tip-17 (Th17) alt gruplarının, dolaşımda aktifleştikten sonra kan-beyin bariyerinin (KBB), subaraknoid boşluğun ve BOS üretiminde görevli koroid pleksusun kan damarları aracılığıyla MSS'ye giriş yaptığı ve burada miyelin kılıf yıkımına katkıda bulunan interferon-gama (IFN- γ) ve IL-17 gibi proenflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarak mikrogliaların, makrofajların ve CD8+ T hücrelerinin MSS'ye girişini teşvik ettiği bilinmektedir (Filippi vd., 2018) (Şekil 1.4). CD8+ sitotoksik T hücreleri de MSS'de miyelin kılıf üretiminden sorumlu olan oligodendrositlerin öldürülmesinde rol oynamaktadır (Goverman, 2009). Birincil otoimmün yanıtı başlatan ve doğrudan nöronal hasara yol açan bu T hücrelerinin periferde aktivasyonlarının nedeni miyelin epitopu ile reaksiyon verebilecek antijen içeren mikrobiyal ajanlar ya da kendi miyelin antijenlerinin CD4+ T lenfositlere sunulması olarak görünmektedir. İmmün yanıtın baskılanmasında görev alan Treg hücrelerinin işlevinde meydana gelen yetersizlikler ve MSS'ye özgü T lenfositlerin Treg aracılı düzenlemeye karşı dirençli olması gibi immün düzenlemeler de periferdeki anormal T hücre aktivasyonunun potansiyel nedenleri olarak düşünülmektedir (Filippi vd., 2018).

MS'in immünopatogenezinde B hücreleri de önemli bir rol oynamaktadır. Başlarda sadece T hücrelerine antijen sunumuyla T hücre aktivasyonuna yol açarak hastalığın

patogenezinde rol aldıkları düşünülse de MS'li hastaların BOS'larında oligoklonal bantların (OKB) ve MSS'deki aktif lezyonlarında CD20+ B hücrelerinin bulunması, B lenfositlerin de hastalıkla doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Miyeline özgü B hücreler MSS'ye girdikten sonra miyelin kılıfları hedef alan antikorlar üreterek ve immünoglobulin G (IgG) birikimine neden olarak MS lezyonlarının oluşumuna katkıda bulunabilmektedir (Goverman, 2009; Yadav vd., 2015). T ve B lenfositler, makrofajlar ve mikroglialar gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin, proenflamatuar sitokinler tarafından MSS'ye çağırılması; periferde bir şekilde aktifleştikten ve KBB aşıldıktan sonra oluşan otoimmün yanıt, MS hastalarında kronikleşerek demiyelinizasyona ve nörodejenereasyona yol açmaktadır (Filippi vd., 2018).



Şekil 1.4: MS immünopatogenezinin temsili bir özeti (Dendrou vd., 2015).

MS'in heterojen ve çok karmaşık immünopatogenezinin anlamak için, bireysel farklılıkların ve çevresel faktörlerin bağışıklık toleransı üzerindeki etkilerinin, otoreaktif bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunun ve bağışıklık yanıtları aracılığıyla enflamasyonun tam olarak aydınlatılması gerekmektedir. Bu sayede MS'li bireyler için gelişmiş terapötik tedaviler oluşturmak da mümkün olacaktır (Yadav vd., 2015).

1.1.4 Multipl Sklerozun tanısı ve klinik tipleri

1.1.4.1 Multipl Sklerozun tanısı

MS tanısı, hastalığın spesifik klinik bir özelliğinin ve yeterli düzeyde tanısal testinin olmaması sebebiyle zor olmaktadır. Hastaların sahip olduğu özelliklerin farklı nörolojik rahatsızlığı bulunan hastalarla benzerlik göstermesi de tanıda ayırıcı olmayı zorlaştırmaktadır. Bu yüzden MS için kesin bir tanı yöntemi bulunmamakla beraber temel amaç MSS’de yayılım gösteren lezyonların hem zamansal hem de mekânsal olarak belirlenmesine ve benzer özelliklerin görüldüğü diğer nörolojik hastalıkların klinik ve laboratuvar yöntemleriyle dışlanmasına dayanmaktadır. Bu yüzden bir dizi standardize edilmiş tanı kriterinin oluşturulması zorunlu hale gelmiştir. Yıllardan beri gelişen bilim ve teknikle ayırıcı tanı kriterleri oluşturmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, 1965 yılında Schumacher ve arkadaşları gelecekteki tüm tanı kriterlerine öncülük edecek ve hepsinin temelini oluşturacak kesin MS tanı kriterlerini belirlemişlerdir (Schumacher vd., 1965). Temel olarak hastalığın MSS’deki zamansal ve mekânsal yayılımının gösterilmesine dayanan Schumacher tanı kriterleri laboratuvar verilerinin de tanıda kullanılmasıyla birlikte yerini 1983 yılında Poser tarafından belirlenen kriterlere bırakmıştır. Poser, klinik ve laboratuvar destekli olmak üzere 4 farklı kesin ve olası MS tanı kategorisi tanımlamıştır. Hastaların BOS’larında bulunan OKB’lerin varlığı temel laboratuvar kanıtı, MR görüntüleri ise para-klinik kanıt olarak kabul edilmiştir (Poser vd., 1983). 2001 yılında McDonald tanı kriterleri geliştirilmiş ve yayımlanmıştır. Önceki tanı kriterlerinden farklı olarak, MRG’ye verilen önem artırılmış, görsel uyarılmış potansiyeller ön plana çıkarılmış, progresif MS tanı kriterleri de belirlenmiş ve BOS’ta IgG indeks yüksekliği de tanıyı destekleyici kriter olarak belirlenmiştir. Bu değişiklikler ve yenilikler sayesinde ilk atakta bile MS tanısının konulması mümkün olmuştur. 2005 ve ardından 2010 yılında yenilenen kriterlerin temel özellikleri ve özgüllüğü korunmuş, MRG ve BOS ile ilgili olan özellikler sadeleştirilerek klinik kullanımı basitleştirilmeye çalışılmıştır. Son olarak 2017 yılında yenilenen kriterler (Çizelge 1.1) önceki prensipleri koruyarak genişletilmiştir ve 2017 Revize McDonald kriterleri adı ile bilinmektedir. Bu revizyonla birlikte hastalık geçmişi de göz önünde bulundurularak hastalığın klinik seyrinin tayin edilebilmesi ve periyodik olarak değerlendirme yapılabilmesi mümkün olmuştur (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018).

Çizelge 1.1: MS tanısı için belirlenen 2017 Revize McDonald kriterleri.

Atak Sayısı	Lezyon Sayısı	Tanı için Gerekli İlave Veri
≥ 2	≥ 2	Yok ^a
≥ 2	1 ve başka bir alandaki lezyona ait net atak ^b	Yok ^a
≥ 2	1	MSS'de farklı lezyonla ilişkili yeni atak veya MRG ^c ile mekânda yayılım görülmesi
1	≥ 2	Ek bir klinik atak veya MRG ^d ile zamanda yayılım görülmesi veya BOS'a özgü OKB ^e varlığı.
1	1	MSS'de farklı bir mekândaki lezyonla ilişkili yeni atak veya MRG ^c 'de mekânda yayılım görülmesi ve ek bir klinik atak veya MRG ^d 'de zamanda yayılım görülmesi veya BOS'a özgü OKB ^e varlığı.
Sinsi İlerleme	1 yıl klinik progresyon (ataktan bağımsız)	Aşağıdaki kriterlerden en az 2 tanesi; 1. MS'e özgü (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥ 1 lezyon 2. Omurilikte ≥ 2 lezyon 3. BOS'ta OKB varlığı

^a: Beyin MRG'si mekânda ve zamanda yayılımın görülmesi için tüm hastalara uygulanmalıdır. Ek bir teste gerek yoktur. Atipik özellikleri olan, tipik KİS olmayan, tanıyı destekleyecek yetersiz MRG ve klinik bulgusu olan hastalarda omurilik MRG'si ve BOS analizi yapılmalıdır. Ek testler yapılmadıysa veya testlerin sonuçları MS'i işaret etmiyorsa alternatif tanımlar değerlendirilmelidir.

^b: Atak öyküsünde yansız ve objektif nörolojik bulgulara dayandırılarak konulan tanı en güvenilir tanıdır. Eğer hasta öyküsündeki atağa ait raporlamış bir nörolojik bulgu yoksa hasta öyküsündeki atakta enflamatuar ve demiyelinizan bir olaya ait klinik gelişim özellikleri ve semptomlar aranmalıdır. Fakat hastanın klinik geçmişindeki ataklar değerlendirilirken en az bir atak öyküsü objektif klinik bulgularla desteklenmelidir.

^c: MRG'de mekânda yayılımın görülmesi; MS'e özgü (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal veya omurilik) alanların ≥ 2 'sinde ≥ 1 lezyon bulunması anlamına gelir.

^d: MRG'de zamanda yayılımın görülmesi; hastalık seyri içerisinde herhangi bir zamanda çekilen MRG'de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların bir arada görüntülenmesi veya ilk MRG'den sonra çekilen takip MRG'sinde ilk MRG referans olarak alındığında en az bir yeni lezyonun tespiti anlamına gelir.

^e: BOS'ta OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda zamanda yayılımın bir göstergesi olarak değerlendirmeye alınır.

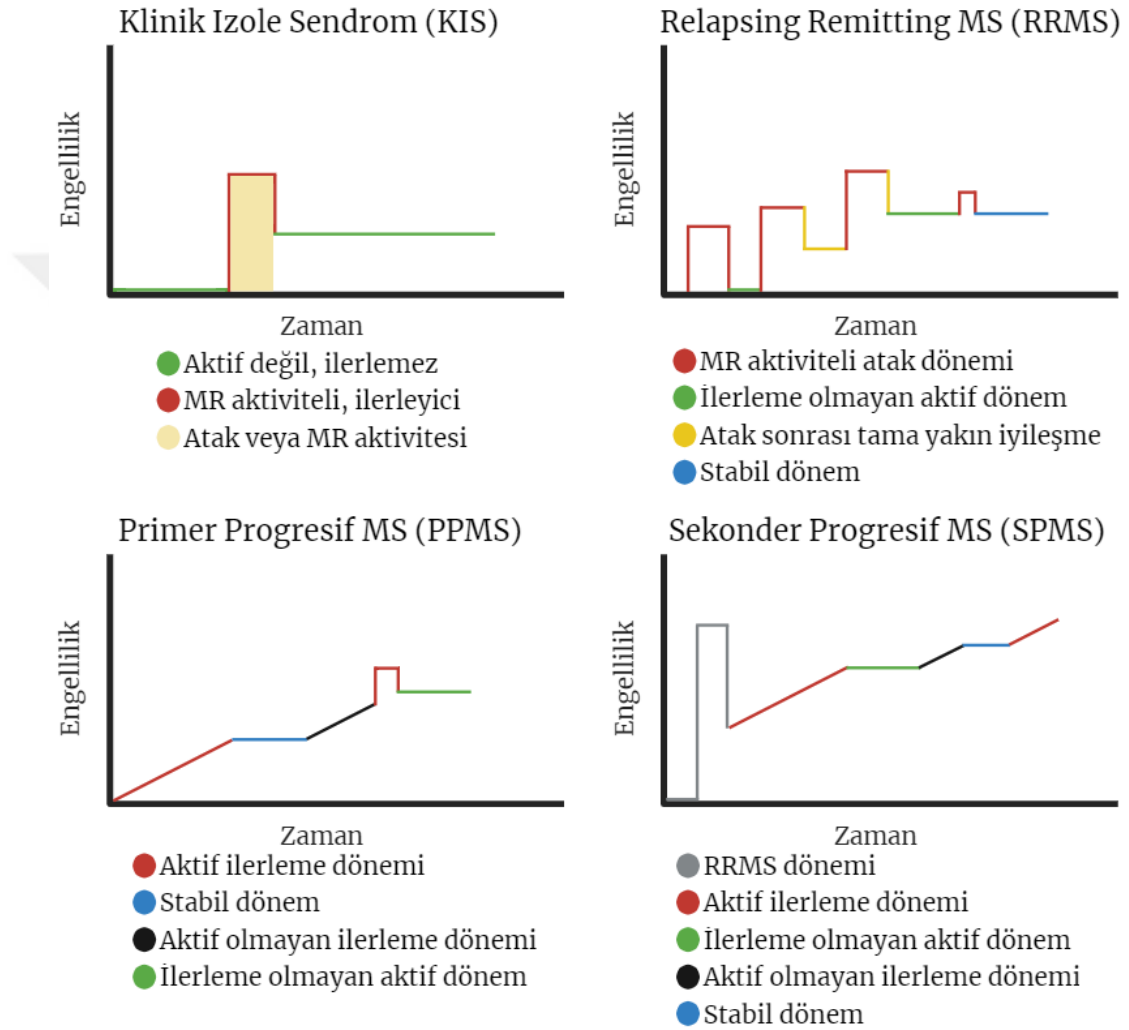
Günümüzde tanıda 2017 Revize McDonald kriterleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kriterler MS’te hızlı teşhis için geliştirilmiş ve bu amaca hizmet etmektedir. Klinikte IgG indeksinin MS’i düşündüren ilk bulgulara sahip hastalarda kontrol edilmesi ve OKB’lerin saptanması MS tanısını hızlandırmaktadır. Bu sayede çok daha erken dönemde hastalar tedaviye başlamakta ve progresif MS tanı kriterleriyle birlikte hastalık geçmişinin gözlemlenebilmesi sayesinde klinik tayinleri hızlıca yapılabilmektedir. MRG’deki gelişmelerin öncülük ettiği revizyonlarla günümüzdeki halini alan tanı kriterleri, MS’te biyobelirteç keşif araştırmalarıyla da gelecekte yeni revizyonlarla güncelliğini sağlayacak ve kesinliğini artıracaktır (Thompson vd., 2018).

1.1.4.2 Multipl sklerozun klinik tipleri

MS’in farklı hastalık seyrine sahip çeşitli klinik alt tipleri tanımlanmıştır. Bu alt tiplerin tanımlanması hastalığın prognozunu ve progresyonunu anlamak ve hastalara uygun tedavi stratejileri geliştirmek için önemlidir. Yapılan sınıflandırmada MS hastalığının fenotipi hastalık aktivitesine ve hastalığın progresyonuna bağlı olarak belirlenmektedir (Şekil 1.5) (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Lublin vd., 2014).

MS’in başlangıç evresi olarak görülen KİS tek bir nörolojik atak öyküsü içeren demiyelinizan enflamatuar olayın klinik bulgularla desteklendiği nörolojik tablodur. KİS’li hastalarda henüz zamanda ve mekânda yayılım göstermeyen enflamatuar demiyelinizan özellikler tespit edilebilir (Lublin vd., 2014). Hastalar optik nöropati ve beyin sapı sendromları gibi klinik bulgulara sahipken MRG’de semptomatik ya da asemptomatik lezyonlar izlenebilmektedir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018). Bu sınıftaki hastalar ilerleyen zamanlarda MS geliştirme risklerinin olması nedeniyle takip edilir ve hastaların MR parametreleri düzenli aralıklarla kontrol edilir. MRG’de yeni plak oluşumu ve BOS’a özgü OKB gösteren hastalarda MS geliştirme riski daha yüksektir. KİS’li hastaların kesin MS tanısı alma oranları literatürde farklılık göstermektedir. Bu yüzden araştırmacılar KİS’ten kesin MS’e geçişi tahmin edebilecek biyobelirteçleri ve MRG bulgularını araştırmaktadır (Canto vd., 2015; Kalincik vd., 2012; Kuhle vd., 2007). MSS’deki miyelin kılıfların bileşenleri olan miyelin oligodendrosit glikoprotein ve MBP’nin dolaşımdaki antikorlarının, KİS’li hastalarda kesin MS gelişme riskiyle ilişkili olmadığı görülmüştür (Kuhle vd., 2007). Bununla birlikte KİS’li hastaların BOS’larındaki kitinaz 3-benzeri 1 protein

seviyelerinin MS ve MS kaynaklı engellilik geliştirme riskiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Canto vd., 2015). MRG parametrelerinin de KİS'ten kesin MS'e geçişi tahmin etmeye yardımcı olabileceği düşünülmektedir. 2 yıl içerisinde kesin MS tanısı alan KİS'li hastaların korpus kallozum alanlarındaki azalmanın, kontrast tutan lezyon sayılarının ve nörolojik fonksiyon bozukluğunun MS geliştirmeyen hastalara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir (Kalincik vd., 2012).



Şekil 1.5: MS'in klinik alt tipleri ve zaman içerisinde hastalık aktivitesinin engelliliğe olan etkisinin temsili gösterimi (Lublin vd., 2014).

Ataklar ve ardından tam veya tama yakın iyileşme dönemlerinin gözlemlendiği RRMS, kesin MS tanısı almış hastaların neredeyse %85'inin klinik alt tipini oluşturmaktadır (Şekil 1.5). Klinikte en yaygın görülen bu fenotipte enflamatuar ve demiyelinizan nedenlerden kaynaklı, en az 24 saat süren yeni nörolojik bulguların belirlendiği veya var olan önceki hastalık bulgularının arttığı kötüleşme dönemi "atak

dönemi” olarak tanımlanır. Kalıcı nörolojik engelliliğe de neden olabilen bu atak dönemlerinden sonra hastalarda tama yakın veya kısmi düzelmelerin görüldüğü iyileşme dönemleri gözlenir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018). RRMS formu biriken nörolojik kusurlarla birlikte SPMS’e dönüşebilir. Hastalık süresi uzadıkça RRMS’ten SPMS’e geçiş oranı artmaktadır. Tedavinin yanlış uygulanması, hastanın tedaviyi yönetmede bireysel yetersizliği ve tedaviye yanıtızsızlık SPMS’e geçişi hızlandırmaktadır (Gross & Watson, 2017).

SPMS, başlangıçta RRMS tanısı alan hastalarda, hastalığın ilerleyen dönemlerde ataklardan bağımsız olarak kademeli bir şekilde kötüleştiği, nörolojik engelliliğin biriktiği ve iyileşme dönemlerinin görülmediği klinik alt form olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.5). İlk atağından sonra 15 yıl içerisinde RRMS hastalarının %25-40’ı bu faza geçmektedir. Günümüzde RRMS’in SPMS’e dönüştüğü geçiş noktasının tespitinde kullanılan net bir patolojik, immünolojik veya MRG kriteri bulunmamaktadır (Lublin vd., 2014).

PPMS hastalarında ise ataklardan ve iyileşme dönemlerinden bağımsız olarak, engellilik düzeyi ve fonksiyon bozukluğu kademeli olarak kötüleşmektedir (Şekil 1.5). PPMS diğer formlardan farklı olarak daha ileri yaşlarda teşhis edilmektedir ve tüm MS klinik alt tiplerinin yaklaşık olarak %10-15’ini oluşturmaktadır (Lublin vd., 2014; Thompson vd., 2018). MS’in kötüleşen bir formu olan PPMS fenotipine sahip hastalarda hastalığın tekdüze bir şekilde sürekli ilerleme göstermemesi ve belirli zaman dilimleri boyunca stabil kalabilmesinden dolayı klinik öyküye ve değişimin nesnel ölçümlerine bakılarak yıllık olarak ilerlemenin tespit edilmesi gerekmektedir. PPMS’li hastalarda hastalık ilerlemesi dört farklı dönemde seyredebilir:

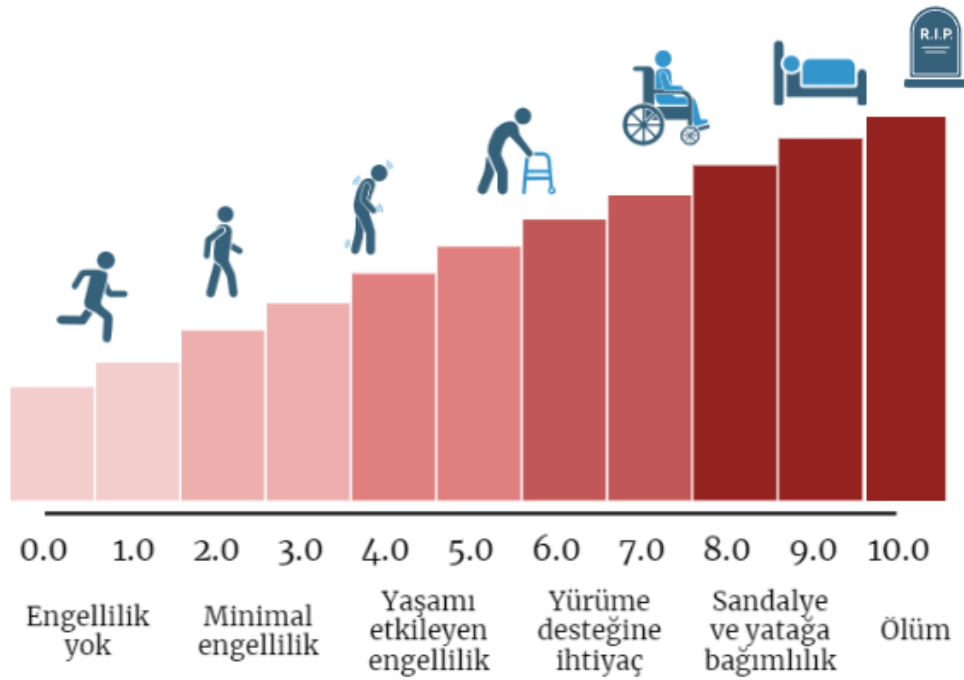
- Aktif, ilerleyen dönem
- İlerleme olmayan aktif dönem
- Aktif olmayan, ilerleyen dönem
- Aktif olmayan, ilerleme olmayan dönem (Stabil dönem)

İlerlemenin takip edildiği bu dört dönemde hastalığın aktifliği akut ataklar ve MRG’de yeni lezyonların varlığı ile belirlenirken progresyon yani ilerleme klinik değerlendirmeye ölçülmektedir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Lublin vd., 2014).

1.1.5 Multipl Sklerozda fiziksel engelliliğin değerlendirilmesi

MS'te klinik alt tipinden bağımsız demiyelinizasyona ve nörodejenerasyona bağlı olarak biriken bir fiziksel engellilik durumu görülmektedir. Klinikte hastaların fiziksel engelliliğinin ölçülmesinde genişletilmiş engellilik durum ölçeği (Expanded disability severity score – EDSS) kullanılmaktadır (Şekil 1.6). EDSS, MS'in her klinik fenotipinde kullanılabilmektedir (Demir, 2022).

1955 yılında Kurtzke, engellilik durum ölçeğinin (Disability status scale – DSS) MS hastalarında fiziksel engelliliğin ölçülmesinde kullanılabileceğini önermiştir. DSS ölçeğinde skorlamanın gerçekleştirilebilmesi için daha sonra fonksiyonel sistem adını alan sekiz farklı fonksiyonel grup belirlenmiştir (Kurtzke, 1955). Fonksiyonel sistemler birbirini kapsamamaktadır ve her fonksiyonel sistem zaman içinde sadece kendisiyle karşılaştırılabilmektedir. Bunun yanı sıra bu sistemler MS'de görülen lezyonlarla ilişkilendirilebilecek tüm kusurları da içermektedirler. DSS'nin bazı durumlarda, orta düzeyde duyarsız olduğunun düşünülmesiyle birlikte genişletilmiş DSS'ye yani EDSS'ye geçiş yapılmıştır (Kurtzke, 1983).



Şekil 1.6: EDSS skorlarının derecelendirmesi ve hastaların engellilik durumları (Kurtzke, 1983).

EDSS skoru hesaplanırken hastaların piramidal, serebellar, beyin sapı, duyuşal, bağırsak ve mesane fonksiyonları, görsel, zihinsel ve mobilizasyon durumları değerlendirilir. Kümülatif olarak EDSS ölçeği yarım puanlık farklar ile MS kaynaklı engelliliği ölçeklendirir. EDSS=0 değeri herhangi bir engelliliğin bulunmadığı normal bir nörolojik muayenenin ölçütüyken, EDSS=10 değeri ise MS'e bağılı ölüm anlamına gelmektedir. EDSS≥4.0'dan sonra hastaların ayağa kalkma, yardımcı ve yardımsız yürüme ve dolaşma durumları değerlendirilir. EDSS=4.0 dinlenmeden ve yardım almadan yaklaşık 500 metre, EDSS=6.0 tek taraflı destekle ve dinlenmeden yaklaşık 100 metre yürüyebilme anlamına gelmektedir. EDSS=7.0 yardımsız 5 metre yürüyememe ve tekerlekli sandalye ihtiyacını, EDSS=7.5 kişinin sandalyesini kendi kendine kullanamadığını yani motorize tekerlekli sandalyeye olan ihtiyacı ifade eder. Hastalarda yatağı bağımlılık, konuşma ve yeme bozuklukları gözlemlendiğinde EDSS≥8 olarak skorlanır (Demir, 2022; Kurtzke, 1983). İşlevsel alanlardan alınan skorların hesaplanması oldukça karmaşıktır ve değerlendirme sınıfları subjektif gözlemlere dayanmaktadır. Bu yüzden her bir sistemin dikkatli bir şekilde notlandırılması gerekmektedir.

MS hastalarında hastalığın ciddiyetinin, ilerleyiş sürecinin, ataklara bağılı ve atak dışı kötüleşmelerin gözlemlenmesi için fiziksel engelliliğin sayısal bir değeri olarak belirlenmesi hem hastaların klinik fenotiplerinin tayininde hem de uygulanan tedavinin yanıtının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (Demir, 2022). Bu nedenle MS hastalarının takibinde EDSS ölçeği klinikte sıkça kullanılmaktadır.

1.1.6 Multipl Sklerozda tedavi

MS'in karmaşık patogenezesinden ve etiyolojisinin tam olarak anlaşılamamış olmasından dolayı hastalığın oluşumunu önleyen ya da hastalığı tamamen iyileştiren bir tedavi bugün hala mevcut değildir. MS'te uygulanan ilaç tedavileri enflamatuvar yanıtları düzenleyerek hastalığın seyrini değiştirmeyi, atak dönemlerinin sıklığını ve şiddetini azaltmayı ve MS'e özgü hasarlardan meydana gelen nörolojik semptomları kısa süreli iyileştirmeyi amaçlamaktadır. Tedavi imkanları MS'in klinik alt tiplerine göre değişiklik göstermektedir ve RRMS formu için daha geniştir. Tedavide atakların oluşumunu engellemek ve hastalığın seyrini değiştirmek için hastalığı düzenleyici tedaviler (Disease modifying therapy – DMT) grubunda yer alan immün-modülatör ve

immün-baskılayıcı ilaçlar kullanılmaktadır. Günümüzde klinikte uygulanan DMT grubu ilaçlar arasında glatiramer asetat, dimetil fumarat, IFN- β , teriflunomid ve fingolimod yer almaktadır. Her ne kadar RRMS hastaları için birden fazla tedavi seçeneği olsa da ilaçların etkinliği bireyler arasında değişmekte ve tedaviye başlanmadan ilacın etkinliği tahmin edilememektedir. Bu yüzden tedaviye başlayan hastalarda hastalık aktivitesi belirli aralıklarla değerlendirilmelidir (Dobson & Giovannoni, 2019; Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Filippi vd., 2018). Bu tez çalışması kapsamında tedavi grubunu oluşturan RRMS hastalarının kullandığı immün-baskılayıcı bir ajan olan fingolimod ve etki mekanizması alt başlıkta anlatılmıştır.

1.1.6.1 Fingolimod

Fingolimod RRMS hastalarında hastalık tedavisinde kullanılan DMT grubu immün-baskılayıcı bir ajandır (Brinkmann vd., 2010). Yapısı ilk olarak 1995 yılında tanımlanan fingolimod, mantar metaboliti olan myriocinin bir türevidir ve yapısal olarak hücre zarının yapısında bulunan endojen sfingozine benzer (Adachi vd., 1995; Willis & Cohen, 2013). 2010 yılının Eylül ayında ABD Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration – FDA) tarafından onaylanmasıyla ağızdan alınan ilk DMT grubu ilaç olmuştur (Willis & Cohen, 2013). Günümüzde hastalık aktivitesi teşhis aldığı günden itibaren yüksek olan ve birinci basamak tedavilerden yanıt alınamayan hastaların tedavisinde kullanılan ikinci basamak bir tedavidir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018).

Sfingolipidler tüm hücrelerde hücre zarının yapısında bulunan ve birçok hücre içi sinyal yolunda yer alan membran bileşenleridir. Sfingozinler, sfingozin kinaz enzimi tarafından fosforile edilir. Fosforilasyon sonucu oluşan sfingozin – 1 – fosfat (S1P), kalp ritmi, nöral hücre çoğalması, endotel geçirgenliği ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesi gibi birçok hücrel süreçte rol oynamaktadır. S1P hücrel görevlerini yerine getirebilmek için beş farklı üyesi bulunan S1P reseptör ailesi (S1P1-5) tarafından tanınmaktadır. S1P1 reseptörleri MSS'de, bağışıklık sisteminde, T ve B lenfositlerde yüksek oranda eksprese edilen, baskın S1P reseptörüdür. S1P1 alt grubu temel olarak kan damarlarının oluşumunu ve endotel bariyerin geçirgenliğini kontrol etse de lenfositlerin lenf nodlarından çıkışını ve nöral hücre çoğalmasını düzenlemektedir. Normal bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde, lenf nodundaki

lenfosit hücreler lenf düğümü ve vücut sıvısı arasındaki S1P konsantrasyon farkına yanıt olarak dolaşıma geri dönmekte ve enflamasyonlu bölgeye ulaşmaya çalışmaktadır (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Jeffery vd., 2011). MS gibi otoimmün hastalıklarda lenfosit hücrelerin enflamasyonlu bölgeye ulaşmasını engelleyerek hastalıkların semptomlarının azaltılması için S1P1 antagonistleri kullanılmaktadır (Brinkmann, 2007; McGinley & Cohen, 2021). S1P1 reseptörünün fizyolojik olarak eksojen ligandlar ile aktivasyonu lenfositlerin dolaşıma geri dönmesinin inhibisyonuyla sonuçlanır. Bu etki RRMS'in klinik tedavisinde kullanımı onaylanan fingolimodun geliştirilmesinde kullanılmıştır (Hanson vd., 2012).

Hücrede sfingozin kinazlar, yapısal olarak endojen sfingozine benzeyen fingolimodu aktif formu olan fingolimod-fosfata dönüştürmektedir. Fingolimod-fosfat, S1P reseptörlerine yüksek bir afiniteyle bağlanan, fonksiyonel bir antagonist görevi görmektedir. Fingolimod-fosfat lenfositlerin üzerinde bulunan S1P1 reseptörlerine bağlanarak reseptörün bozulmasına ve yüzey ekspresyonunun azalmasına neden olur. Azalan reseptör ekspresyonu lenfositlerin S1P yoğunluk farkına duyarsızlaşmasına yol açar ve T hücrelerinin lenf dokularından dolaşıma geri dönmelerine engel olmaktadır. Bu şekilde lenfositlerin MSS'ye girişini engellemektedir (Willis & Cohen, 2013).

Fingolimodun etkinliğinin incelendiği çalışmalara bakıldığında fingolimod ile tedavi edilen hastaların dolaşımda CD+4 ve CD+8 T hücrelerinin yüzdelerinin azaldığı gösterilmiştir (Mehling vd., 2008). Ayrıca fingolimod KBB'yi geçip MSS'ye girerek, burada bulunan oligodendrositler, astrositler ve mikroglialar tarafından eksprese edilen S1P reseptörlerine bağlanarak etkinlik göstermektedir. KBB'yi geçtikten sonra MSS içerisinde fosforile olan fingolimod, S1P reseptörlerine bağlandıktan sonra remiyelinizasyonun artmasına, oligodendrositlerin apoptozunun inhibisyonuna ve proenflamatuar sitokinlerin salgılanmasının azalmasına neden olmaktadır (Coelho vd., 2007; Foster vd., 2007).

1.2 mikroRNA'lar

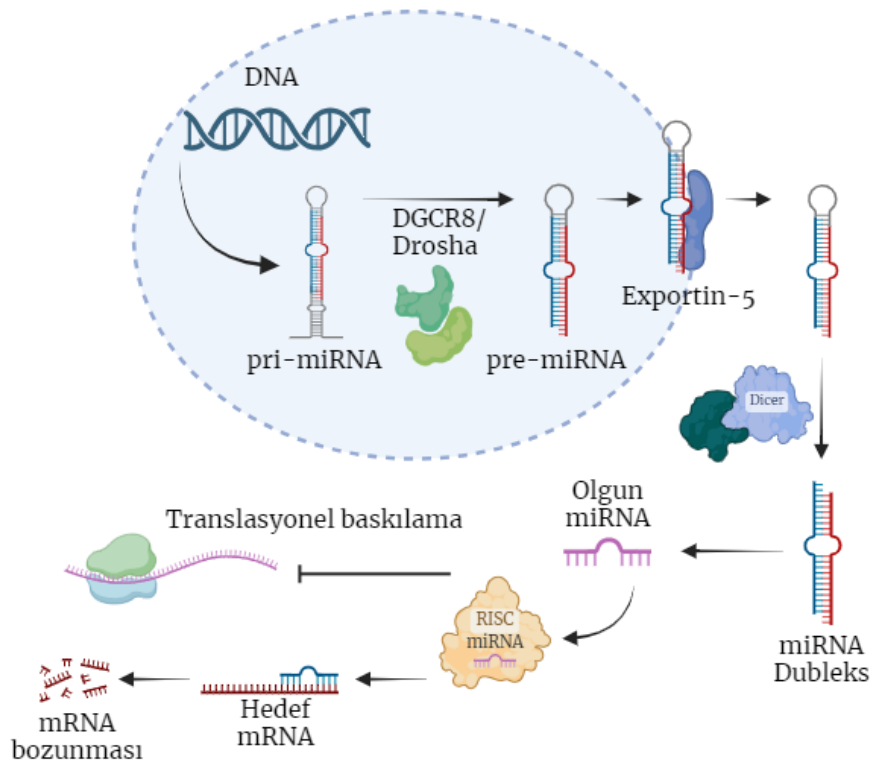
mikroRNA'lar (miRNA), transkripsiyon sonrası diziye özgü bir şekilde gen düzenlenmesinde görev alan, 18-24 nükleotit uzunluğunda, küçük, kodlamayan RNA dizileridir (He & Hannon, 2004). miRNA'ların ilk olarak yuvarlak solucanlarda

gelişimsel süreçlerin düzenleyicileri oldukları keşfedilmiştir. 1993 yılında ipliksi solucanda (*Caenorhabditis elegans*) protein kodlamayan *lin-4*'ün tamamlayıcı bir diziye sahip olduğu *lin-14* genini baskılamasıyla ilk küçük RNA keşfedilmiş, ardından hayvan ve bitki genomlarında birçok miRNA geni olduğu ortaya çıkartılmıştır (Lee vd., 1993; Pasquinelli, 2012). miRNA'ların protein kodlamamalarına rağmen hedef mRNA'ya tamamlayıcı olan dizileri sayesinde gen düzenlenmesinde diziye özgü olarak rol aldığı bilinmektedir. Taşıdıkları bu çekirdek dizi sayesinde hedef mRNA'ya bağlanarak neredeyse bütün ökaryotlarda gen düzenlemesinin ana elemanları oldukları anlaşılmıştır (Pasquinelli, 2012). Protein kodlayan genlerin birçoğunda miRNA düzenlemesinin varlığı, bu RNA ailesinin hedefledikleri genler, proteinler ve biyolojik sinyal yolları ile hücrel gelişim ve farklılaşma, metabolizma, göç ve apoptoz gibi birçok biyolojik sürece dâhil olmasına neden olmaktadır (Kim vd., 2009).

Sahip oldukları rollerden dolayı miRNA'ların pek çok hastalıkla ilişkisi günümüzde sıkça çalışılmaktadır. miRNA'ların farklı hastalıklarda tanısallık, prognostik ve terapötik biyobelirteç olma potansiyellerinin incelenmesi, hastalıkların patogenezinin karmaşıklığı göz önünde bulundurulduğunda henüz başlangıç aşamasındadır. Buna rağmen birçok biyoteknoloji ve ilaç firması miRNA endüstrisine büyük ölçüde kaynak ayırmaktadır. miRNA'nın görevini yerine doğru bir şekilde getirememesinden kaynaklanan domino etkisiyle hastalıkların ortaya çıkışı, hastalık teşhisi için miRNA'ları popüler birer biyobelirteç olarak karşımıza çıkarmaktadır. Ek olarak miRNA ekspresyon seviyesini etkileyen patolojik süreçlerin anlaşılması ve değişen ekspresyon seviyelerinin hastalıklarla ilişkilendirilmesi sebebiyle spesifik miRNA mimiklerinin ve antagomiR'lerin kullanılarak miRNA fonksiyon bozukluklarının düzeltilmesi amaçlanmaktadır (Bonneau vd., 2019). miRNA tabanlı terapötik ajanların geliştirilmesi için klinik öncesi ve klinik araştırmalar kanser başta olmak üzere birçok hastalıkta yaygınlaşmıştır. Farklı kanser türlerinin tedavisinde targomir için faz 1 klinik araştırmaları tamamlanmışken, hepatit C virüs enfeksiyonu tedavisi için miravirsen ve T hücreli lenfoma tedavisi için cobomarsen faz 2 klinik araştırmalarına başlanan ajanlara örnek verilebilir. Önümüzdeki 20 yıl içerisinde piyasaya sürülecek birçok terapötik ajanın miRNA bazlı olacağı düşünülmektedir (Chakraborty vd., 2021; Kim & Croce, 2023).

1.2.1 mikroRNA biyogenezi

miRNA biyogenezi çekirdekte başlar. RNA polimeraz II ile genomik DNA'dan transkribe edildikten sonra oluşan saç tokası yapısındaki moleküle birincil miRNA (pri-miRNA) adı verilir. pri-miRNA DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 – DGCR8)/Drosha enzim kompleksi tarafından işlenerek daha sonra sitoplazmaya çıkacak olan öncül miRNA'ya (pre-miRNA) dönüştürülür. Yaklaşık 70 nükleotit uzunluğunda ve saç tokası yapısını koruyan bu öncül yapı Exportin-5 enzimi tarafından sitoplazmaya taşınır. Burada saç tokası yapısı bir RNaz III endonükleazı olan Dicer enzim kompleksi tarafından kesilir ve olgun miRNA'yı oluşturacak olan miRNA dubleksleri elde edilir. Oluşan bu dubleksin her iki kolunda da gen düzenlenmesinde rolü olan olgun miRNA'lar bulunmaktadır. Olgun miRNA'lar çift zincirli yapılarından ayrıldıktan sonra Argonaute proteinlerine bağlanarak RISC kompleksini oluştururlar. Hedef mRNA'ların genellikle 3'kodlamayan bölge (Untranslated region – UTR) kısımlarına bağlanarak, translasyonel baskılama ve mRNA bozunması ile transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinde görev alırlar (Şekil 1.7) (He & Hannon, 2004; Kim vd., 2009; Pasquinelli, 2012).



Şekil 1.7: miRNA biyogenezinin temsili şeması (Kim vd., 2009).

1.2.2 Dolaşımdaki mikroRNA'lar

miRNA'ların sadece hücrelerde değil hücre dışı ortamlarda ve farklı vücut sıvılarında da bulunduğu ortaya çıkmıştır. Dolaşımdaki bu miRNA'lar hücre dışı ortamda oldukça kararlıdır. Var olan kararlılıkları ve dolaşımdaki serbest hareketleri sayesinde, belirli yollar ile, alıcı hücrelere iletebilir ve hedef genlerin düzenlenmesindeki görevlerini yerine getirebilirler. Tükürük, periton sıvısı, BOS, idrar, anne sütü ve gözyaşı gibi birçok vücut sıvısında bulunabilen miRNA'lar, serum/plazmada da varlık göstermektedir (Sohel, 2016). miRNA'lar dolaşıma farklı yollar ile katılsa da, hedef bölgeye ulaştıklarında görevlerini yerine getirmektedirler. Dolaşıma katılan bu miRNA'lar hücreler arası iletişimde yeni birer mesajcı olarak görülmektedir (C. Zhao vd., 2019). Deneysel olarak dolaşımdaki bu miRNA'lar ile çalışmak, spesifik kan hücrelerinin veya veziküllerin saflaştırılması gibi zaman alıcı ve zorlu basamakları içermemektedir. Fizyolojik ve patolojik süreçlerdeki rollerinin de araştırılmaya başlanmış hatta ortaya çıkarılmış olması ve deneysel olarak araştırmacılara sunduğu avantajlar dolaşımdaki miRNA'ların kandan çalışılabilecek, pratik ve hızlı sonuç verebilecek, hastalıklar için potansiyel erken tespit biyobelirteçleri olarak önerilmelerine neden olmuştur (Backes vd., 2016; C. Zhao vd., 2019).

1.2.3 Multipl sklerozda mikroRNA'ların rolü

miRNA'ların organizma için büyük önem taşıyan birçok biyolojik süreçte kritik bir role sahip olmaları ve hücre farklılaşmasından apoptoza, enflamasyondan immün yanıtın oluşmasına kadar geniş bir yelpazede hücresel fonksiyonların ve yanıtların düzenlenmesinde etkili olmaları, keşfedildikleri günden bu yana hastalıklarla ilişkilerinin sıkça çalışılmasına neden olmuştur. MS'in karmaşık yapısının çözülmesinde, klinik evrelerinin ve tedavi yanıtının aydınlatılmasında da miRNA fonksiyon bozukluklarının anlaşılmasının önemi oldukça fazladır. Sadece kan hücrelerinde ve MSS'de oluşan lezyonlardaki miRNA'lar değil, serum/plazmada bulunan, hücreler arası haberleşmede görevli dolaşımdaki miRNA'ların da rolünün araştırılması MS'in patogenezinin anlaşılmasına, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve tedavi yanıtlarının pratik bir şekilde klinikte takip edilmesine yardımcı olacaktır (Fenoglio vd., 2012).

Literatüre bakıldığında bugüne kadar dolaşımdaki birçok miRNA'nın MS ile ilişkisinin çalışıldığı görülmektedir. Tedavi almayan MS hastalarının serum miRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, miR-145'in ekspresyon seviyesinin MS hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüş ve tanısal bir biyobelirteç olarak potansiyeli değerlendirilmiştir (Søndergaard vd., 2013). Bir başka çalışmada ise nöron büyümesi, MSS'nin onarımı ve remiyelinizasyonda rol oynayan bir protein olan nöronal hücre yapışma molekülünü hedefleyen miR-572'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyesinin MS hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca aynı miRNA'nın RRMS hastalarında atak ve iyileşme dönemlerinde de farklılık gösterdiği görülmüştür. miR-572 serum ekspresyon seviyesinin klinik fenotipten bağımsız olarak EDSS skorlarıyla korelasyon göstermesi de araştırmacıların miR-572'nin MS için ayırıcı bir molekül olabileceğini düşünmesine neden olmuştur (Mancuso vd., 2015). miR-15b, miR-23a ve miR-233'ün dolaşımdaki ekspresyon seviyelerinin ise MS hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. MS ile ilişkilendirilmiş bu miRNA'ların hastalığı tanımlamada yeni bir yolun öncüsü olabilecekleri düşünülmektedir (Fenoglio vd., 2013). Enflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde rolü olduğu bilinen miR-34a ve miR-125a'nın da plazma ekspresyon seviyelerinin RRMS hastalarında kontrollere göre daha yüksek olduğu ancak yine enflamasyonla ilişkili olduğu bilinen miR-146a'nın dolaşımdaki ekspresyon seviyesinin kontrollere göre RRMS hastalarında daha düşük olduğu gösterilmiştir (Giuliani vd., 2021).

Dolaşımdaki miRNA'lar hastalığın ayırıcısı olabileceği gibi MS'in klinik alt tipleri arasında da farklılık gösterebilmektedir. Gandhi ve arkadaşları gerçekleştirdikleri bir çalışmada hücre döngüsünün düzenlenmesinde görevli olan genleri hedefleyen miR-92'nin ve nörodejenerasyonla ilişkili olan ve T lenfosit aktivasyonundan sorumlu let-7'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyelerinin SPMS hastalarında RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca miR-92 EDSS skorları ve hastalık süresi ile de ilişkili bulunmuştur (Gandhi vd., 2013). Progresif MS alt tipleri ve kontrol grubunun karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise progresif MS tanısı alan hastalarda doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde rol alan miR-191-5p'nin plazma ekspresyon seviyesinin

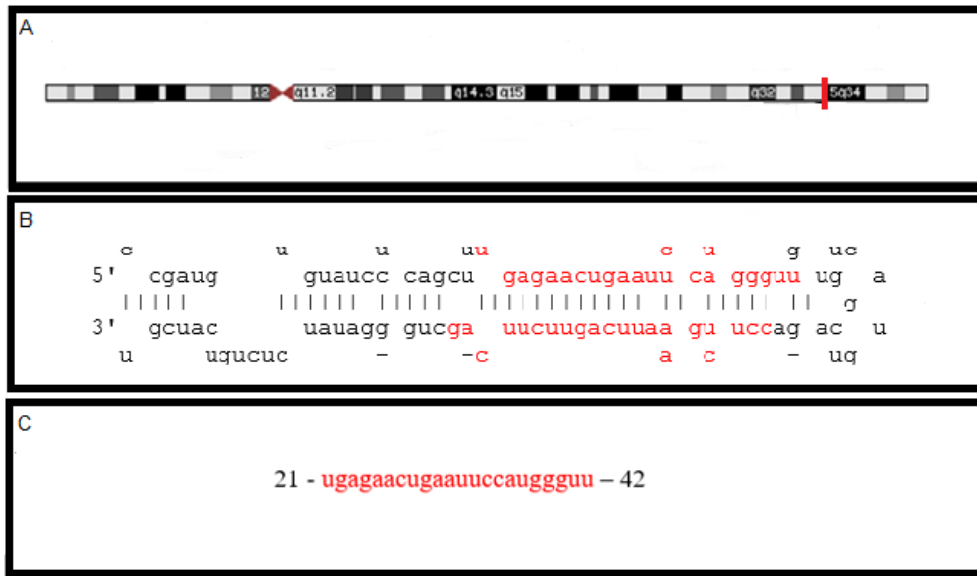
kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Vistbakka vd., 2017). Proenflamatuar immün yanıtın düzenlenmesinde ve nöronal farklılaşmada, hücrel çoğalmada ve apoptozda görev alan miR-128-3p'nin ve mRNA hedef bölgelerine doğrudan bağlanarak IFN- γ ekspresyonunu inhibe ettiği bilinen miR-24-3p'nin PPMS tanısı alan hastalarda SPMS tanılı hastalara göre dolaşımda daha fazla eksprese olduğu bildirilmiştir. Bu spesifik miRNA'ların MS'in ilerleyici alt tiplerinin immünopatogenezinde rol oynadığı ve umut vadeden biyobelirteçler olduğu görülmüştür (Vistbakka vd., 2017). Yine bir başka çalışmada miR-128-5p'nin serum/plazma ekspresyon seviyelerinin progresif MS hastalarında RRMS hastalarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Zanoni vd., 2020).

Dolaşımdaki miRNA'ların ekspresyon seviyeleri MS'de uygulanan tedavi yanıtlarının gözlemlenebilmesi için de biyobelirteç potansiyeline sahiptir. Öyle ki yapılan çalışmalara bakıldığında miR-146a-5p, miR-125a-5p ve miR-155'in dolaşımdaki ekspresyon seviyelerinin dört aylık dimetil fumarat tedavisinden sonra azaldığı görülmüştür (Giuliani vd., 2021). Fenoglio ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği boylamsal bir çalışmada tedaviye başlamadan önce RRMS hastaların dolaşımdaki miR-15b, miR-23a ve miR-223 ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Bu hastalar fingolimod tedavisine başladıktan altı ve dokuz ay sonra bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin yükseldiği ve kontrol grubuna yaklaştığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar MS hastalarının dolaşımdaki anormal miRNA ekspresyon seviyelerinin fingolimod tedavisi ile düzeldiğini göstermiştir. Araştırmacılar serum/plazma miRNA ekspresyon seviyelerinin tedavi yanıtının gözlemlenebilmesi için bir biyobelirteç olabileceğini önermişleridir (Fenoglio vd., 2016).

MS için kolay erişilebilir, hastalığa özgü ve kandan bakılabilen biyobelirteçlere olan ihtiyaç devam etmektedir. Literatüre bakıldığında dolaşımdaki miRNA'ların MS ile ilişkisinin çalışıldığı çok sayıda araştırma görülmekte ve bu araştırmaların sonuçları da gelecek çalışmalara ışık tutmaktadır. Bugün birçok araştırmacı ve firma miRNA'ların hastalıkların tanısında, prognozunda ve tedavi yanıtlarının izlenmesinde kullanılabilecek biyobelirteçler olma potansiyellerinin farkındadır (Dobson & Giovannoni, 2019). Bu tez çalışması kapsamında hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-196a-5p'nin MS ile ilişkisi değerlendirilmiştir.

1.2.3.1 hsa-miR-146a-5p

İnsanlarda 5. kromozomun q kolunun 33.3 bölgesinde bulunan *MIR146A* geninden sentezlenen, 22 nükleotit uzunluğundaki miR-146a-5p omurgalı türler arasında oldukça korunmuştur (Şekil 1.8). Birincil transkript olan pri-miR-146a protein kodlayan farklı bir genin intronundan değil, kendi bağımsız gen dizisinden sentezlenir ve kendine ait farklı bir promotör bölgesine sahiptir. Bu promotör bölge CCAAT-artırıcı bağlayıcı protein-beta (CCAAT-enhancer binding protein-beta – C/EBPβ), IFN düzenleyici faktör 3/7 (IFN regulatory factor 3/7 – IRF3/7) ve nükleer faktör-κB (NF-κB) için bağlanma bölgeleri içermektedir (Iacona & Lutz, 2019).



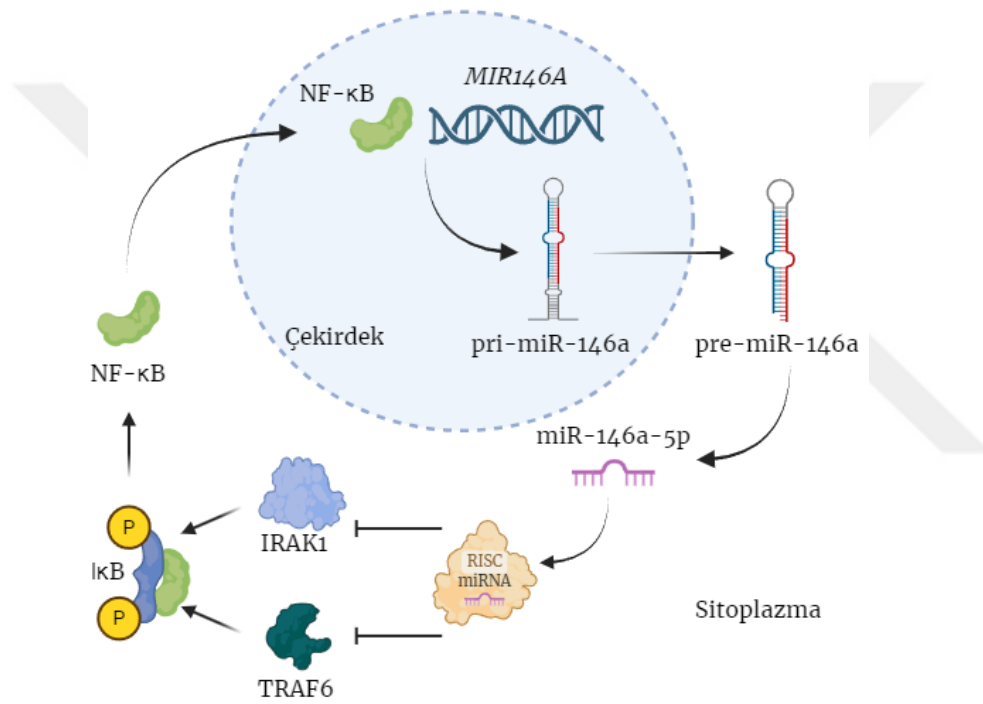
Şekil 1.8: *MIR146A* geninin lokasyonunun (A), hsa-miR-146a'nın saç tokası yapısının (B) ve olgun hsa-miR-146a-5p'nin dizisinin (C) gösterimleri (Iacona & Lutz, 2019).

miRTarBase ve miRDB veri tabanlarına bakıldığında hsa-miR-146a-5p'nin organizmada hedeflediği yüzlerce gen olduğu görülmektedir. Tümör nekroz faktör (Tumor necrosis factor – TNF) reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TNF receptor associated factor 6 – *TRAF6*), IL-1 reseptörü ile ilişkili kinaz 1 (Interleukin 1 receptor associated kinase 1 – *IRAK1*), SEC23 etkileşimli protein (SEC23 interacting protein – *SEC23IP*) ve protein fosfataz 1 düzenleyici inhibitör alt birimi 11 (Protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 11 – *PPP1R11*) gibi genler hedef skoru ve korunmuş bölge sayısı yüksek olan genlere örnek olarak verilebilir (URL-1).

MIR146A geninin ürünü olan miR-146a-5p, toll-benzeri reseptör (Toll-like receptor – TLR) /NF- κ B sinyal yolağının ana negatif düzenleyicisidir (Şekil 1.9). NF- κ B ise *MIR146A* genini pozitif olarak düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Olgun miR-146a-5p TLR/NF- κ B yolağının sinyal bileşenleri olan *TRAF6* ve *IRAK1* genlerini inhibe ederek TLR/NF- κ B sinyalleşmesinin düzenlemesine negatif bir geri besleme döngüsüyle etki eder (Iacona & Lutz, 2019; Iyer vd., 2012). miR-146a-5p'nin hedefi olan IRAK-1 TLR-miyeloid farklılaşması birincil yanıt geni 88 (Myeloid differentiation primary response 88 – *MYD88*) sinyal yolunda kritik bir role sahip önemli bir moleküldür. IRAK-1, MyD88 ile birleştikten sonra fosforile olur ve TRAF-6 ile bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks inhibitör κ B (IkB)'nin fosforilasyonuna ve bozulmasına neden olarak, NF- κ B'nin aktivasyonuna ve çekirdeğe geçişine yol açar. Çekirdeğe giren transkripsiyon faktörü NF- κ B, *MIR146A* ve birçok enflamatuvar genin transkripsiyonunu indükleyerek enflamatuvar sitokinlerin sentezini etkiler. Aktive olmuş NF- κ B'nin *MIR146A* genindeki promotör bölgeye bağlanmasıyla ekspresyonu artan olgun miR-146a-5p, IRAK-1 ve TRAF-6'yı inhibe ederek TLR/NF- κ B sinyal yolağının inhibisyonuna neden olmaktadır. Artan miR-146a-5p seviyelerinin IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin seviyelerini azaltarak enflamasyonu düşürebileceği görülmüştür (Saba vd., 2014; Taganov vd., 2006; Wang vd., 2019; Zhou vd., 2019). Örneğin, miR-146a-5p'nin TRAF6 aracılı NF- κ B sinyal yoluyla IL-1 β kaynaklı kondrosit apoptozunu indüklediği ve kireçlenme hastalığının tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceği gösterilmiştir (Shao vd., 2020).

miR-146a-5p doğuştan ve adaptif bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasında ve yanıtlarının modülasyonunda görev almaktadır (Rusca & Monticelli, 2011). Farelerde Th1 ve Th2 hücreleri arasında farklı seviyelerde eksprese edilmesi, miR-146a-5p'nin bu bağışıklık sistemi hücrelerinin olgunlaşmasında rol oynayabileceğini düşündürmüştür (Monticelli vd., 2005). İnsanlarda antijen ile henüz etkileşime girmemiş T hücrelerinde düşük seviyede eksprese edilen miR-146a-5p'nin, hafıza T hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edildiği görülmüştür. İnsan T hücrelerinde NF- κ B aracılı miR-146a-5p indüklenmesinin IL-2 üretimini bozarak bu hücrelerde hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Curtale vd., 2010; Taganov vd., 2006). Adaptif bağışıklık sistemi yanıtlarının düzenleyicisi olarak görev alan ve immün homeostaziyi

koruyan Treg hücreleri için de miR-146a-5p yaygın olarak ifade edilen miRNA'lar arasındadır. Düşük miR-146a-5p seviyelerinin Treg hücrelerinin fonksiyonlarını kaybetmelerine, immünolojik toleransın ve immün homeostazinin bozulmasına yol açtığı gösterilmiştir (Lu vd., 2010). Bir başka çalışmada, miR-146a-5p'nin epidermal Langerhans hücrelerinde, çevresel TLR ligandlarına olan aktivasyon eşiğini artırmak için interstisyel dentritik hücrelere göre daha fazla eksprese edildiği bulunmuştur (Jurkin vd., 2010). Ek olarak, IRAK-1'in miR-146a-5p aracılı inhibisyonunun, yenidoğanlarda doğuştan gelen bağışıklık toleransını indükleyerek epitelyal hasara karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (Chassin vd., 2010).



Şekil 1.9: miR-146a-5p'nin negatif geri besleme yoluyla NF-κB sinyal yolunu düzenlemesinin temsili gösterimi (Iyer vd., 2012).

Doğal ve adaptif bağışıklık yanıtın doğru bir şekilde düzenlenememesi, immün sistem homeostazisinin bozulmasına ve sonrasında otoimmün hastalıkların gelişiminde ve ilerleyişinde önemli bir rol oynar. İmmün sistem hücrelerinde farklı ekspresyon düzeylerine sahip miR-146a-5p, bağışıklık yanıtlarının ve aktivitesinin düzenlenmesinde görev alabildiği gibi enflamasyonun ve otoimmünitenin de önemli bir düzenleyicisi olarak organizmada görev yapmaktadır. miR-146a-5p'nin biyolojik rolünün genetiği değiştirilmiş farelerde incelendiği bir çalışmada, *MIR146A*^{-/-} (knock-out) farelerin lipopolisakkarite (LPS) yanıt olarak yüksek miktarda proenflamatuar

sitokin ve ikincil haberciler ürettiği görülmüştür. Ek olarak, bu farelerde kanlarında yüksek miktarda otoantikor, çoklu organ iltihabı, dalak büyümesi, lenfadenopati gibi otoimmün bir hastalığın klasik patolojik belirtilerine bağlı erken ölümler gözlemlenmiştir. Bu bulgular sonucunda araştırmacılar, bağışıklık yanıtının düzgün bir şekilde sonlandırılmasında miR-146a-5p'nin kritik bir rolü olduğunu ve regülasyonunun bozulmasının otoimmün hastalıklara yol açabileceğini ortaya çıkarmışlardır (Boldin vd., 2011).

miR-146a-5p'nin sinir sistemi bileşenleri üzerinde oynadığı etkin rol de fonksiyonel olarak nörodejeneratif hastalıklarla güçlü bir ilişkisinin olduğunu ispatlar niteliktedir. *MIR146A* geninin NF-κB transkripsiyon faktörü tarafından pozitif olarak düzenlenmesi sonucunda artan miR-146a-5p ekspresyon seviyesi, IRAK1 ve TRAF6 inhibisyonu ile sonuçlanan negatif bir geri besleme döngüsünü çalıştırmaktadır (Juźwik vd., 2019). miR-146a-5p'nin T hücre yapışmasını azaltarak bağışıklık sistemi hücrelerinin KBB'yi geçme yeteneğini bozması *in-vitro* bir çalışmada gösterilmiştir. Ayrıca miR-146a-5p'nin yüksek seviyede ekspresyonunun demiyelinizan EAE modellerinde *IRAK1*'i inhibe ederek OPC'lerin olgun, miyelin üreten oligodendrositlere farklılaşmasını teşvik ederek remiyelinizasyonu desteklediğine dair sunulan deneysel sonuçlar, miR-146a-5p'nin MS gibi nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu bir rol oynayabileceğini desteklemektedir (Juźwik vd., 2019; Wu vd., 2015; Zhang vd., 2017).

MS ile ilişkisinin çalışıldığı makalelere bakıldığında miR-146a-5p'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyesinin hasta gruplarında kontrol gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük olduğu gösterilmiştir (Giuliani vd., 2021; Saridas vd., 2022). İki sene içerisinde MS'e bağlı engellilik gelişimi gösteren hastaların dolaşımdaki miR-146a-5p ekspresyon seviyelerinin engellilik progresyonu göstermeyen hastalara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Casanova vd., 2023). Ek olarak MS hastalarının EDSS skorları ile miR-146a-5p ekspresyon seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir (Dominguez-Mozo vd., 2022). MS tedavisinde kullanılan ilaçlarla olan ilişkisi de çalışılmış olan miR-146a-5p'nin daha önce glatiramer asetat tedavisi alan hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde (Peripheral blood mononuclear cells – PBMCs) ekspresyon seviyesinin tedavi almayan hastalara göre daha az olduğu gösterilmiştir (Waschbisch vd., 2011). Bir

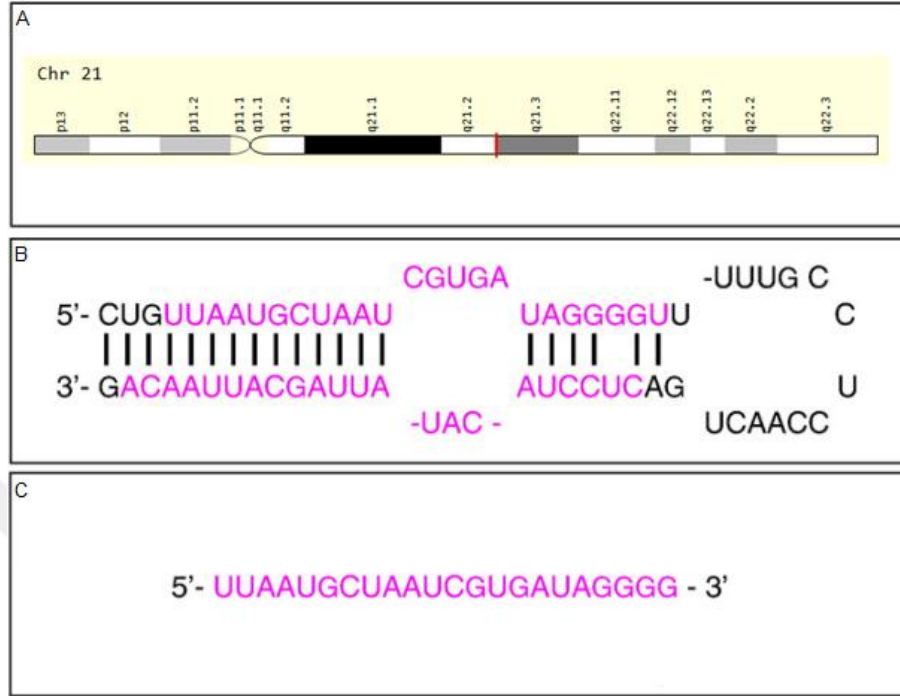
başka çalışmada ise dimetil fumarat tedavisi alan RRMS hastalarında tedaviye başladıktan 4 ay sonra dolaşımdaki miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (Giuliani vd., 2021). Bu miRNA'nın dolaşımdaki ekspresyon seviyesi ile fingolimod tedavisi arasındaki ilişki henüz çalışılmamıştır. MS hastalığıyla ilişkisi bulunan miR-146a-5p'nin ve immün-baskılayıcı bir tedavi ajanı olan fingolimodun enflamatuvar sitokinler üzerine olan etkileri bilinmektedir. Bu sebepten dolayı dolaşımdaki miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin MS'le ve fingolimod tedavisiyle olan ilişkisinin çalışılmasına karar verilmiştir. Bu tez çalışmasında ilk kez dolaşımdaki miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisiyle olan ilişkisi çalışılmıştır. *MIR146A* geni üzerinde bulunan ve bu tez çalışmasında incelenmiş olan genetik polimorfizmin dolaşımdaki ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi daha önce psödoeksfoliyasyon sendromu (PEX) ve romatoid artrit (RA) gibi hastalıklarda çalışılmış olsa da (Bogunia-Kubik vd., 2016; Can Demirdöğen vd., 2023) MS hastalığında ilk kez bu tez kapsamında çalışılmıştır. Kontrol grubunda, tedavi almayan ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında dolaşımdaki miR-146a-5p ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak bu miRNA'nın MS hastalığı için kandan bakılabilen bir biyobelirteç olabilme potansiyeli değerlendirilmiştir.

1.2.3.2 hsa-miR-155-5p

İnsanlarda B hücresi entegrasyon kümesi olarak adlandırılan 21. kromozomun q kolunun 21.3 bölgesinde bulunan *MIR155HG* (Host gene – HG) geninden sentezlenen ve 65 nükleotit uzunluğundaki pre-miR-155'in işlenmesiyle oluşan miR-155-5p, oldukça korunmuştur ve memelilerde immün yanıtların oluşmasında ve enflamatuvar süreçlerde önemli bir rol oynar (Şekil 1.10) (Zingale vd., 2022).

miRDB ve TargetScan 8.0 gibi veri tabanlarına bakıldığında, miR-155-5p'nin hedeflediği mRNA'ların toplam 596 iyi korunmuş ve 240 zayıf korunmuş bölge içerdiği tahmin edilmektedir. IκB kinaz ε (Inhibitor of nuclear factor κ-B kinase ε – *IKKε*), *MyD88*, reseptörle etkileşime giren protein kinaz 1 (Receptor interacting protein kinase 1 – *RIPK1*), çinko parmak protein 652 (Zinc finger protein 652 – *ZNF652*), sitokin sinyal proteini 1'i baskılayıcı protein (Suppressor of cytokine signaling protein 1 – *SOCS1*) ve src homoloji alanı 2 içeren inositol 5-fosfat 1 (Src

homology domain 2-containing inositol 5-phosphatases 1 – *SHIP1*) gibi genler miR-155-5p'nin yüzlerce hedefi arasından en yüksek hedef skoruna ve korunmuş bölge sayısına sahip olan genlerdir (URL-2, URL-3).



Şekil 1.10: *MIR155HG* geninin lokasyonunun (A), hsa-miR-155'in saç tokası yapısının (B) ve olgun hsa-miR-155-5p'nin dizisinin (C) gösterimleri (Faraoni vd., 2009).

miR-155-5p enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde güçlü bir aktivatör olmasından dolayı enflamma-miR olarak da adlandırılmaktadır (Maciak vd., 2021). B ve T hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması da dâhil olmak üzere birçok bağışıklık sürecinin düzenlenmesinde görev alması, enflamatuar süreçlerin başlangıcında kritik bir rolü olduğunu düşündürmektedir (Xiaoyan vd., 2017). miR-155-5p'nin enflamatuar süreçlerdeki rolü ilk olarak B hücre lenfoması üzerinde yapılan bir çalışmada miR-155-5p'nin ekspresyonu arttıkça enflamasyonun da artmasıyla gösterilmiştir (Eis vd., 2005). miR-155-5p'nin *SHIP1* ve *SOCS1*'in negatif düzenleyicilerini hedef almasının, *SHIP1* ve *SOCS1*'in ekspresyonun artmasına ve bu proteinlerin hedefleri olan *AKT* ve *IFN* yanıt genlerinin aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir (O'Connell vd., 2012). Ek olarak yapılan başka çalışmalarda, miR-155-5p'nin NF- κ B sinyal yolunu baskılayarak IL-1 β tarafından indüklenen enflamasyonu etkili bir şekilde azaltması ve akut solunum rahatsızlığı bulunan domuzlarda enflamatuar faktörlerdeki değişiklikleri etkilemek

için miR-155-5p/NF-κB sinyal yolunun seçilmiş olması, miR-155-5p'nin NF-κB aracılı bir miRNA olduğunu göstermektedir (Hu vd., 2022; Liu vd., 2019). Bu çalışmalara ek olarak, TLR sinyal yolunu düzenleyerek enflamatuar yanıtı katkı sağladığı da araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Hu vd., 2022; Korotkov vd., 2020). Enflamatuar yanıtın kontrolünde görev alan SHIP1 ve SOCS1'in miR-155-5p tarafından düzenlenmesinin yanı sıra, bu miRNA'nın NF-κB'ye bağımlı bir miRNA olması ve farklı hedefler üzerinden enflamatuar yanıtların değişiminde görev alması, miR-155-5p'yi enflamatuar yanıtın kontrolü için potansiyel bir hedef haline getirmektedir (Hu vd., 2022; Xu vd., 2022).

Birçok çalışmada miR-155-5p'nin B hücrelerinin üretiminde, CD8⁺ T hücrelerinin modülasyonunda, CD4⁺ T hücrelerinin Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerine farklılaşmasında, sitokinlerin ve kemokinlerin düzenlenmesinde ve bazı transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasında etkin rol alarak immün sistem homeostazının ve bağışıklık sistemi yanıtlarının önemli bir düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir (Rodriguez vd., 2007; Seddiki vd., 2014). Enflamasyonla ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesiyle karakterize edilmiş olan miR-155-5p, nörodejeneratif bozukluklarla da ilişkilendirilmiştir. Glial aktivasyon ve proenflamatuar sitokin üretimi ile başlayan nöroenflamasyon gelişiminin destekleyicisi rolünde olduğu gösterilmiştir (Slota & Booth, 2019). Makrofajlar ve mikroglialarda SOCS1 ve SHIP1 gibi enflamasyon inhibitörlerini modüle ederek ve mikroglialarda transkripsiyonel faktör p53 tarafından aktive edildikten sonra, anti-enflamatuar süreçleri etkileyen c-Maf'ı hedefleyerek enflamasyonu indüklediği gösterilmiştir (Cardoso vd., 2012; O'Connell vd., 2012; Su vd., 2014).

miR-155-5p'nin nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklardaki rolü incelendiğinde demiyelinizasyonda etkin bir şekilde görev aldığı görülmüştür. miR-155-5p'nin, TNF-α, IL-1b ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinleri üreten mikrogliaların aktivasyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Aktive edilen bu mikroglialar IL-1α, TNF ve kompleman bileşeni 1q salgılayarak astrositlerin nörotoksik formu olan A1 formuna polarizasyonunu teşvik eder. Artmış A1 tipindeki astrositler nöronların ve oligodendrositlerin ölümüne yol açabilir (McCoy, 2017). Ek olarak, miyelini fagosite eden makrofajların aktivasyonunda da rol oynadığı bildirilmiştir (Junker vd., 2009).

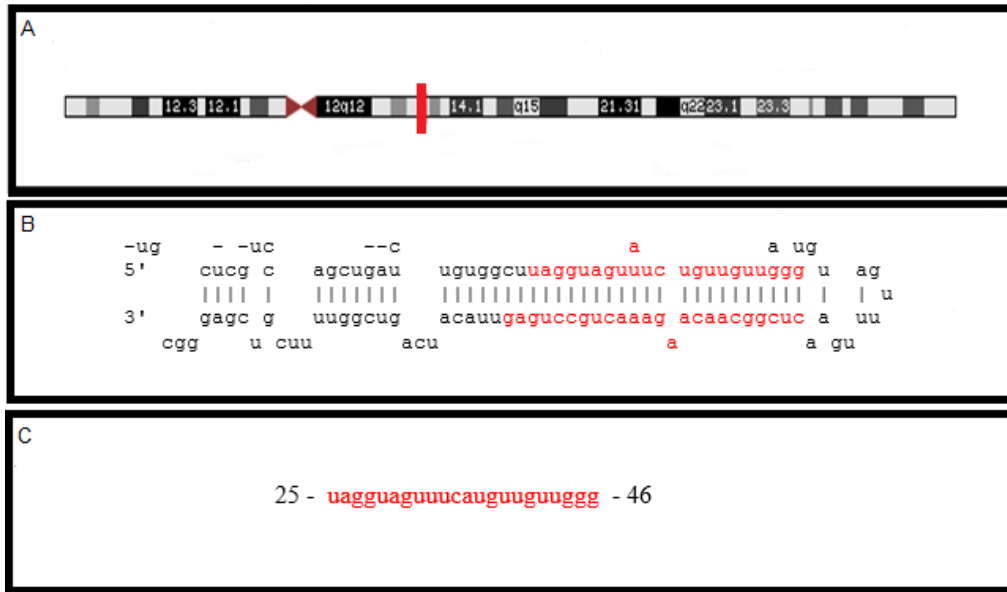
Enflamatuvar yanıtının ve bağışıklık tepkisinin ana düzenleyicisi rolünde tanımlanan miR-155-5p, nörodejeneratif hastalıklarda artan ekspresyonuyla birlikte nöroenflamasyonu da artırarak hastalık progresyonunu hızlandırabilmektedir (Juźwik vd., 2019). MS ile ilişkisinin incelendiği çalışmalarda dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyesinin MS hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (Balkan & Bilge, 2021). RRMS hastalarıyla yapılan bir başka çalışmada ise atak dönemlerinde hastalarda dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Niwald vd., 2017). Ayrıca miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin tedaviyle birlikte de değiştiği gösterilmiştir. Dimetil fumarat tedavisi alan hastalarla gerçekleştirilen bir çalışmada tedavinin başlangıcından 4 ay sonra miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin azaldığı raporlanmıştır (Giuliani vd., 2021). Daha önce RRMS hastalarında fingolimod tedavisinin dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi çalışılmamıştır. Enflamatuvar yanıtının düzenleyicisi olan miR-155-5p'nin proenflamatuvar sitokinler üzerinde etkisi olduğu bilinen fingolimod tedavisi ile ilişkisinin araştırılması, bu tedaviyi alan hastalarda tedavi durumunun miR-155-5p ekspresyon seviyeleri üzerinden gözlemlenebilmesi için umut vadetmektedir. Bu tez çalışmasında ilk kez dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisiyle olan ilişkisi çalışılmıştır. Ayrıca *MIR155HG* geni üzerinde bulunan ve bu tez çalışmasında incelenmiş olan genetik polimorfizmin dolaşımdaki ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi daha önce diyabetik retinopati ve RA gibi hastalıklarda incelenmiş olsa da (Polina vd., 2019a; Shaker vd., 2019) MS hastalığında ilk kez bu tez kapsamında çalışılmıştır. Kontrol grubunda, tedavi almayan ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak bu miRNA'nın MS hastalığı için kanda bakılabilen bir biyobelirteç olabilme potansiyeli değerlendirilmiştir.

1.2.3.3 hsa-miR-196a-5p

İnsanlarda 12. kromozomun q kolunun 13.13 bölgesinde homeobox (*HOX*) kümelerinin bulunduğu (*HOXC10* ve *HOXC9* arasında) bölgede yer alan *MIR196A2* geninden sentezlenen çift zincirli, saç tokası yapısındaki pre-miR-196a-2'nin 5' kolundan oluşan 22 nükleotitlik olgun hsa-miR-196a-5p, ilk olarak Lagos-Quintana ve arkadaşları tarafından 2003 yılında fare dokularından ve insan osteosarkoma hücre hattından tanımlandı (Şekil 1.11) (URL-4; Lagos-Quintana vd., 2003). Birincil

transkript olan pri-miR-196a-2'nin ekspresyonu *HOX* genleri kümesinin ekspresyonunu düzenleyen faktörlerden etkilenebildiği gibi, yüksek hareketli grup (High mobility group A – HMGA) proteinlerinin de *MIR196A2* geninin yukarı akış bölgesine (up-stream region) doğrudan bağlanarak bu miRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebildiği gösterildi (Chen vd., 2011; Mansfield vd., 2004).

Farklı veri tabanlarına ve literatüre bakıldığında miR-196a-5p'nin toplamda 407 korunmuş bölge içeren 374 hedefinin olduğu görülmektedir. Bu hedeflerinin içinde *HOX* ve forkhead kümeleri (Forkhead box – *FOX*), *HMGA2*, annexin-A1 (*ANXA1*) ve nükleer reseptör alt ailesi 6, grup A, üye 1 (Nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1 – *NR6A1*) gibi birçok düzenleyici gen yüksek hedef skoruna sahiptir. miR-196a-5p ayrıca *IκBα*'yı hedefleyerek NF-κB sinyal yolunun aktivasyonunda da yer almaktadır (URL-5, Zhang vd., 2022). Hedeflediği düzenleyici genler dolayısıyla hücresel gelişim, bağışıklık ve bağışıklık yanıtlarının oluşumu ve kanser patogeneğinde önemli roller oynamaktadır (Chen vd., 2011).



Şekil 1.11: *MIR1962* geninin lokasyonunun (A), hsa-miR-196a2'nin saç tokası yapısının (B) ve olgun hsa-miR-196-5p'nin dizisinin (C) gösterimleri (URL-4; Lagos-Quintana vd., 2003).

Yekta ve arkadaşları 2004 yılında servikal karsinom hücre hattında bu miRNA'nın mRNA bozunmasıyla *HOXB8*, *HOXC8*, *HOXD8* ve *HOXA7*'nin ekspresyon seviyelerini düzenlemede görev aldığını göstermiştir (Yekta vd., 2004). Daha sonra miR-196a-5p ile *HOXB8* arasındaki etkileşimin tavuklarda embriyonik dönemde uzuv

gelişimini etkilediği ve Afrika pençeli kurbağasında (*Xenopus laevis*) miR-196a-5p'nin erken gelişim sırasında aşırı ekspresyonunun göz anomalilerine sebep olduğu gösterilmiştir (Hornstein vd., 2005; Qiu vd., 2009). Ayrıca, transkripsiyonu HMGA1 proteini tarafından düzenlenen pre-miR-196a-2'nin ürünü olan miR-196a-5p, HMGA2 proteinin mRNA'sının 3'UTR bölgesindeki iki farklı çekirdek diziyeye bağlanarak bu proteinin ekspresyonunu düzenlendiği bildirilmiştir (De Martino vd., 2009). HMGA2 proteinin yokluğunda farelerde gelişimsel anomalilerin gerçekleştiği rapor edilmiştir (Chiappetta vd., 1996; Zhou vd., 1995). Sonuç olarak, miR-196a-5p'nin embriyonik gelişimde önemli rolü olan *HOX* kümesi ürünlerinin ve nükleer mimaride kritik rol oynayan HMGA proteinlerinin ekspresyonlarının düzenlenmesinde görev alması, bu miRNA'nın hücresel gelişimde etkin rol oynayan bir molekül olduğunu göstermektedir.

miR-196a-5p'nin tümör dokusunun proliferasyonunda, farklılaşmasında, metastazında ve spesifik kanser türlerinde kemoterapiye ve radyoterapiye olan duyarlılığının değişmesinde onkojenik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Pin vd., 2012; Zhu vd., 2023). Yapılan bir çalışmada miR-196a-5p'nin *FOXO1*'i hedefleyerek hücre göçünü ve invazyonunu artırdığı ve apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Zhu vd., 2023). Bir başka çalışmada *ANXA1*'i hedefleyerek hücre göçünün ve anjiyogenezin inhibisyonuna yol açtığı ortaya konulmuştur (Pin vd., 2012). Ayrıca miR-196a-5p'nin *IκBα* inhibisyonuyla NF-κB sinyal yolunu aktive ederek, tümör hücresi canlılığını artırabildiği ve radyoterapiye olan duyarlılığı azaltabileceği rapor edilmiştir (Yao vd., 2023).

Yapılan bir biyoinformatik analiz çalışması sonucunda, miR-196a-5p'nin nöron gelişiminde, canlılığında ve işlevlerinin sürdürülmesinde görev alan beyin türevli nörotrofik faktör (Brain-derived neurotrophic factor – *BDNF*) genini ve *HOX* kümelerini hedefleyerek nörodejeneratif bir hastalık olan Huntington hastalığının progresyonunda anahtar bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Wang vd., 2020). Ek olarak gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda miR-196a-5p'nin, sistemik skleroz ve polimiyozit gibi otoimmün hastalıkların patogeneğinde yer aldığı düşünülen düzenleyici yolları hedeflediği ve bu sebeple hastalık progresyonuyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Gao vd., 2019; Jin vd., 2023).

miR-196a-5p'nin MS ile ilişkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma vardır. 2018 yılında yayımlanan bir çalışmada atak dönemindeki RRMS'li hastaların PBMC'lerinde miR-196a-5p ekspresyon seviyesinin iyileşme dönemindeki hastaların PBMC'lerinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum miR-196a-5p'nin MS'te atak ve iyileşme dönemlerinin moleküler işleyişinde kritik bir rol oynadığını düşündürmüştür (Baulina vd., 2018). MS hastalarında tedaviyle ilişkisi daha önce hiç çalışılmamış olan miR-196a-5p'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyelerinin de MS hastalığındaki rolüne dair örnek bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında ilk kez dolaşımdaki miR-196a-5p ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisiyle olan ilişkisi çalışılmıştır. *MIR196A2* geni üzerinde bulunan ve bu tez çalışmasında incelenmiş olan genetik polimorfizmin dolaşımdaki ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi daha önce idiopatik infertilite ve PEX gibi hastalıklarda incelenmiş olsa da (Can Demirdöğen vd., 2023; Lu vd., 2016) MS hastalığında ilk kez bu tez kapsamında çalışılmıştır. Kontrol grubunda, tedavi almayan ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında dolaşımdaki miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri karşılaştırılarak bu miRNA'nın MS hastalığı için kandan bakılabilen bir biyobelirteç olabilme potansiyeli değerlendirilmiştir.

1.3 Tek Nükleotit Polimorfizmleri

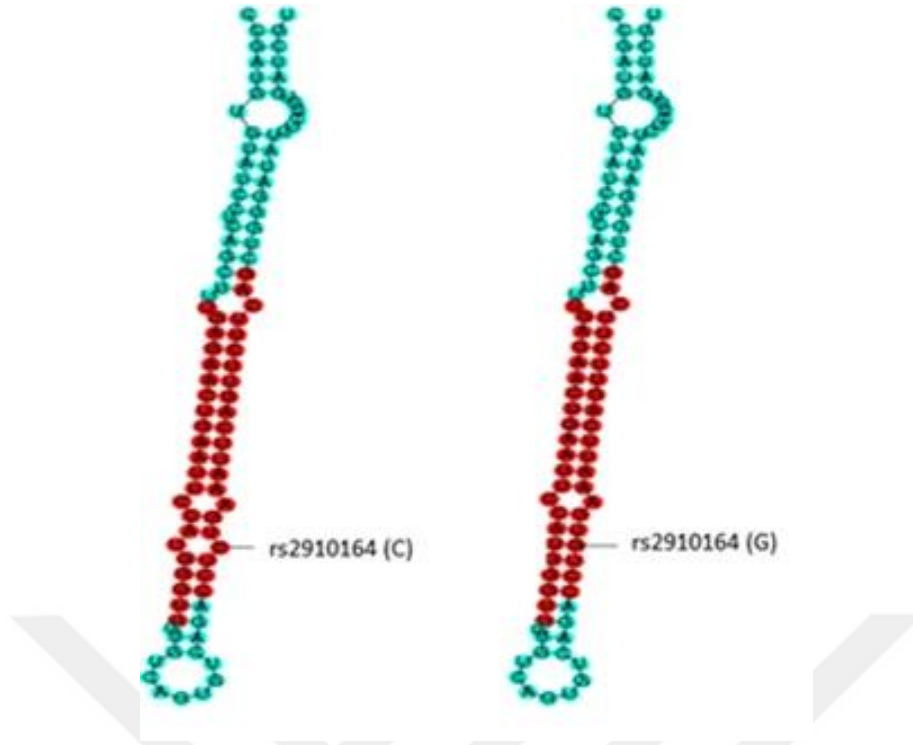
Canlılar arasındaki genetik benzerlik ve türler arası korunmuş gen dizileri olmasına rağmen aynı türe ait farklı bireyler arasında kalıtsal ve çevresel faktörlerden kaynaklanan ve fenotipe yansıyan DNA dizi farklılıkları gözlemlenebilmektedir. Bu varyasyonların her birinin bir popülasyon içerisindeki mevcudiyeti %1'den fazla ise buna genetik polimorfizm adı verilmektedir. DNA dizi farklılıkları başka bir deyişle genetik polimorfizmler bir diziden kaynaklanabileceği gibi, bir dizi üzerindeki tek bir nükleotitin farklı olmasından da kaynaklanabilir. Genomun belli bir konumunda tek bir nükleotitin farklı olmasından kaynaklanan bu polimorfizmlere tek nükleotit polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism – SNP) adı verilir (Nelson vd., 2004).

SNP'ler insan genomunda oldukça yaygın bir şekilde görülebilmektedir. Farklı konumlarda ve herhangi bir gen dizisi üzerinde farklı sayıda bulunan SNP'ler genomda bulundukları konuma göre etkisiz olabilirler ancak kodlayan bölgede bulunmaları halinde aminoasit dizisinde değişikliklere neden olarak o gen dizisine ait

proteinin yapısını ve işlevini bozabilirler. Aminoasit dizisinde değişiklik yaratmasalar da mRNA'nın yapısını ve stabilitesini etkileyerek oluşan ürün miktarını değiştirebilirler. Düzenleyici bölgelerde bulunarak gen düzenlemesini etkileyebilir, genlerin 3' UTR bölgelerinde yer aldıklarında bu tez kapsamında daha önce anlatılan miRNA'ların çekirdek dizilerine bağlanamamasına yol açarak transkripsiyon sonrası gen düzenlemesini etkileyebilir ve genin ifade seviyesi üzerinde değişikliklere sebep olabilirler. SNP'ler her zaman bir hastalığın tek başına bir nedeni veya açıklayıcısı değildir fakat bireylerin hastalığa yatkınlığını ve ilaç metabolizmalarını etkileyerek hastalıklara yol açabilir, tedavi sürecini etkileyebilmektedirler. Bu yüzden SNP'lerin kapsamlı olarak araştırılması ve hastalıklarla ilişkisinin incelenmesi hem kişiselleştirilmiş tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini hem de genetik belirteçler olarak kullanımlarını mümkün kılmıştır (Deng vd., 2017; Koçan, 2018).

1.3.1 *MIR146A* rs2910164 G/C

MIR146A rs2910164 SNP'si *MIR146A* geninde 5:160485411 konumunda bulunan intronik bir tek nükleotit varyanttır. Bu SNP'nin minör aleli olan C alelinin global minör alel frekansı (gMAF) 0.245 iken majör alel olan G alelinin gMAF değeri 0.755'tir. Minör ve majör alelin farklı toplumlarda ve kıtalarda alel frekansı değişiklik göstermektedir (URL-6). SNP, pre-miR-146a'nın saç tokası yapısı içinde bulunduğu için saç tokası yapısının sahip olduğu Gibbs serbest enerjisinin değişmesine yol açmaktadır (Şekil 1.12) (Iwai & Naraba, 2005; Rehmsmeier vd., 2004). Meydana gelen bu değişiklik pri- ve pre-miRNA'ların stabilitesini ve miRNA biyogenezinde görev alan proteinlerle eşleşmelerini bozarak, olgun miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olmaktadır (Jazdzewski vd., 2008). Yapılan farklı çalışmalarda rs2910164 G/C SNP'si meme kanseri, yumurtalık kanseri, oral skuamöz hücreli karsinom ve hepatosellüler karsinom ile ilişkili bulunmuştur (Hung vd., 2012; Shen vd., 2008; Xu vd., 2008). Hem meme hem de yumurtalık kanseri hastalarında minör C alelinin varlığı teşhis yaşının küçülmesiyle ilişkilendirilirken, oral skuamöz hücreli karsinom hastalarında yine minör C aleli hastalığın ilerlemesiyle ilişkili bulunmuştur (Hung vd., 2012; Shen vd., 2008). Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise erkek bireylerde GG genotipine sahip olmanın hepatosellüler karsinom geliştirme riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Xu vd., 2008).



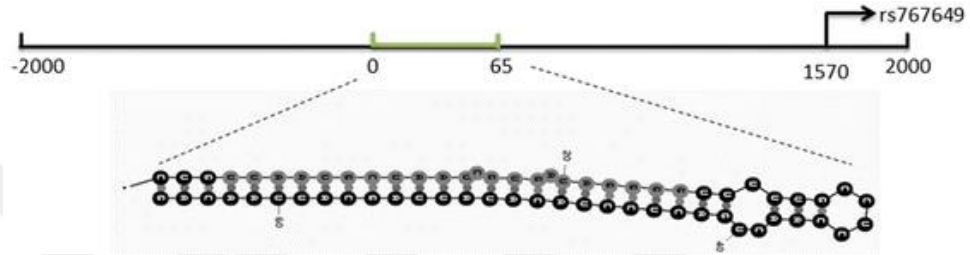
Şekil 1.12: *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin temsili gösterimi (Rehmsmeier vd., 2004).

MIR146A rs2610164 G/C SNP'sinin sistemik lupus eritematozus (SLE) ve RA gibi otoimmün hastalıklar ile arasındaki ilişki daha önce çalışılmıştır (Bogunia-Kubik vd., 2016; Jiménez-Morales vd., 2012; Löfgren vd., 2012). Aynı şekilde otoimmün enflamatuvar bir hastalık olan Behçet hastalığıyla olan ilişkisine bakıldığında hasta grubunda G alel frekansının kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Kamal vd., 2022). Ayrıca C alelinin miR-146a-5p ekspresyon seviyesini azalıp, TLR2'nin fonksiyonunu ve üretimini bozarak nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığına genetik yatkınlıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2015).

MS ile ilişkisi de daha önce Çin ve Irak popülasyonları üzerinde çalışılmış ve minör alel olan C aleli MS için bir risk faktörü olarak belirlenmiştir (Y. Li vd., 2015; Shareef vd., 2021); ancak bu SNP'nin Türk toplumunda miR-146a-5p ekspresyon seviyesi üzerine etkisi ve MS ile ilişkisi daha önce çalışılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında bu SNP'nin MS ile ilişkisi ve dolaşımdaki olgun miR-146a-5p ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

1.3.2 *MIR155* rs767649 T/A

MIR155 rs767649 SNP'si *MIR155* geninin 21:25572410 konumunda promotör bölgesi üzerinde bulunan bir SNP'dir. Bu SNP'nin minör aleli olan A alelinin gMAF değeri 0.066 iken majör alel olan T alelinin gMAF değeri 0.934'tür. Minör ve majör alelin farklı toplumlarda ve kıtalarda alel frekansı değişiklik göstermektedir (URL-7). SNP'nin gen ekspresyonunu başlatan promotör bölgede bulunması, bu bölgeye NF- κ B gibi transkripsiyon faktörlerinin afinitesini etkileyerek olgun miRNA ekspresyon seviyesini değiştirmektedir (Şekil 1.13) (K. Xie vd., 2015).



Şekil 1.13: *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin temsili gösterimi (K. Xie vd., 2015).

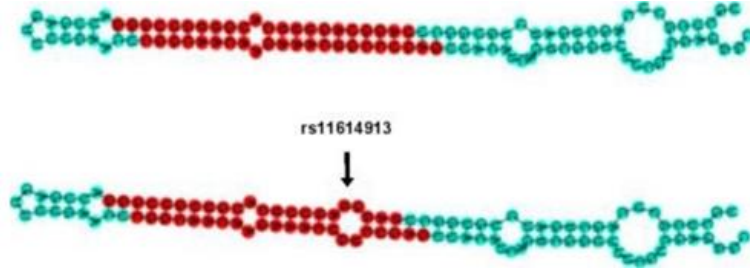
miR-155-5p'nin hedeflediği genler göz önünde bulundurulduğunda olgun miRNA'nın ekspresyon seviyesinde meydana gelen değişikliklerin hastalıkların patogeneziinde kritik bir öneme sahip olabileceği düşünülmektedir. Kansere ilişkisinin incelendiği çalışmalarda T alelinin daha yüksek miR-155-5p ve dolayısıyla daha düşük SOCS1 seviyelerine neden olarak serviks, akciğer ve meme kanserlerinin patogeneziyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Iranparast vd., 2023; Wang vd., 2016; Xie vd., 2015). Mısır ve Çin popülasyonunda yapılan çalışmalarda T alelinin SLE hastalığına genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mohammed vd., 2021; Wang vd., 2022). Ayrıca RA hastalarında kontrol grubuna göre TT genotipinin frekansının anlamlı derecede yüksek olduğu rapor edilmiştir (Shaker vd., 2019). MS gibi otoimmün enflamatuar bir hastalık olan Behçet hastalığında heterozigot genotipe sahip hastaların, hastalığın aktivite durumunun izlenmesi için kullanılan Behçet Hastalığı Güncel Aktivite İndekslerinin daha yüksek olduğu ve rs767649 T/A SNP'sinin Behçet hastalığı riskiyle ve hastalığın progresyonuyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Abdelaleem & Shaker, 2021). İmmün sistem ve enflamatuar yanıtların oluşmasıyla ilgili olan miR-155-5p'nin ekspresyon seviyesini etkileyen bu SNP'nin farklı hastalıklarla ilişkili olduğunun gösterilmesi MS ile de ilişkisinin sorgulanmasına

neden olmuştur. Literatürde rs767649 T/A SNP'sinin tek başına ve farklı SNP'ler ile bir arada bulunduğu zaman MS'e genetik yatkınlıkla ilişkili olabileceği sunulmuştur (M. Ali vd., 2020; Hamid vd., 2020). Daha önce Türk toplumunda MS hastalarında bu SNP'nin hastalıkla ilişkisi ve dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisi çalışılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında bu SNP'nin MS ile ilişkisi ve dolaşımdaki olgun miR-155-5p ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

1.3.3 **MIR196A2 rs11614913 C/T**

MIR196A2 rs11614913 SNP'si *MIR196A2* genin 12:53991815 konumunda bulunan intronik bir tek nükleotit varyanttır. Bu SNP'nin minör aleli olan T alelinin gMAF değeri 0.377 iken majör alel olan C alelinin gMAF değeri 0.623'tür. Minör ve majör alelin farklı toplumlarda ve kıtalarda alel frekansı değişiklik göstermektedir (URL-8). SNP pre-miR-196a2'nin 3' UTR bölgesinde bulunduğu için pri- ve pre-miRNA'nın olgun formuna işlenmesini olumsuz yönde etkilemektedir (Şekil 1.14). Sadece olgun miR-196a-5p ekspresyon seviyesini etkilemekle kalmayıp hedef genler üzerinden fonksiyonel değişikliklere neden olan bir SNP'dir. Yapılan *in vitro* bir çalışmada pre-miR-196a2 üzerinde C alelini bulunduran hücrelerde olgun miRNA ekspresyon seviyesinin T aleli bulunduranlardan 4.9 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Hoffman vd., 2009).

Bu SNP'nin daha önce birçok kanser türüyle ilişkisi çalışılmıştır. Birden fazla bilimsel çalışmanın sonuçlarının birleştirildiği istatistiksel analizlerde homozigot CC genotipinin ve C alelinin akciğer, meme ve hepatosellüler karsinom riskiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Liu vd., 2018). Kanser dışında SLE, RA, Behçet hastalığı ve MS gibi otoimmün enflamatuvar hastalıklarla olan ilişkisi de çalışılmış ve sonuçlar farklı hastalık türlerinde farklı popülasyonlarda değişiklik göstermiştir (Alemán-Ávila vd., 2017; Golshani vd., 2018; J. Qi vd., 2013; Toraih, Ismail, vd., 2016; Yenmis vd., 2021a). Öyle ki Meksika popülasyonunda SLE hastalığı için bir risk faktörü olmadığı öne sürülürken, Mısır popülasyonunda farklı SNP'ler ile bir aradayken RA hastalığına genetik yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (Alemán-Ávila vd., 2017; Toraih, Ismail, vd., 2016). Aynı şekilde Çin popülasyonunda yapılan bir çalışmada T aleli ve TT genotipi Behçet hastalığı ile ilişkili bulunurken, Türk toplumunda yapılan başka bir çalışmada bu SNP Behçet hastalığı ile ilişkilendirilmemiştir (J. Qi vd., 2013; Yenmis vd., 2021a).



Şekil 1.14: *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin temsili gösterimi (Hoffman vd., 2009).

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'sinin MS ile olan ilişkisi de İran ve Rus popülasyonlarında çalışılmış fakat bu SNP MS'e yatkınlık ve EDSS skorlarıyla ilişkili bulunmamıştır (Golshani vd., 2018; Kiselev vd., 2015). SNP'lerin hastalıklarla olan ilişkisi etnik kökenin, cinsiyetin, belirli bir popülasyonda paylaşılan davranışların ve coğrafi etmenlerin katkısıyla değişiklik gösterebilmektedir. Her ne kadar farklı toplumlarda çalışılmış olsa da bu SNP'nin MS hastalığıyla olan ilişkisi daha önce Türk toplumunda çalışılmamıştır. Bu nedenle bu tez çalışmasında bu SNP'nin MS ile ilişkisi ve dolaşımdaki olgun miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

1.4 Çalışmanın Amacı

Travma harici nörolojik engelliliğin en yaygın sebebi olan MS nöroenflamatuar, otoimmün, demiyelinizan bir MSS hastalığıdır (Dobson & Giovannoni, 2019). Farklı toplumlarda görülme sıklığı değişiklik gösterse de daha çok genç erişkinlerde görülen bu hastalık ölümcül olmamakla birlikte nörodejeneratif doğası gereği birçok semptom ile hastanın yaşam kalitesini ve bireyin iş yapabilme durumunu olumsuz yönde ciddi derecede etkilemektedir (Filippi vd., 2018). Farklı klinik alt tipleri ile karakterize edilmiş olan MS hastalığının ortaya çıkışını ve ilerleyişini tetikleyen tek bir sebep bulunmamakla birlikte kesin bir tedavi yöntemi de belirlenememiştir. Kullanılan mevcut tedavi yöntemleri hastalığı tamamen iyileştirmeyi değil hastalığın seyrini yavaşlatmayı ve semptomlarını azaltmayı hedeflemektedir. Her ne kadar hastalığın teşhisi, takibi ve fiziksel engelliliğin değerlendirilebilmesi için birkaç farklı klinik metot bulunuyor olsa da hastalığa yatkınlığa neden olan, hastalığın seyrini etkileyen ve ilaçlara verilen farklı tepkilerin altında yatan faktörlerin bilinmesi sayesinde riskli kişiler için daha sıkı nörolojik takipler gerçekleştirilebilir ve ilaç tedavisi planlamaları

kişiyeye özel olarak ve daha isabetli biçimde yapılabilir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018; Thompson vd., 2018).

Fingolimod MS tedavisinde ikinci basamakta kullanılan ve S1P reseptör modölatörü olarak görev alan, ağızdan alınan immün-baskılayıcı bir ajandır (Willis & Cohen, 2013). Fingolimod periferde lenfositler üzerinde eksprese edilen S1P reseptörlerine yüksek bir afiniteyle bağlanarak lenf düğümlerinden lenfosit çıkışını önlemekte ve immün sistemi baskılamaktadır. Ayrıca KBB'yi geçebilme yeteneğine sahip olan fingolimod, MSS içerisinde fosforile olabilmekte ve S1P reseptörlerine bağlanarak proenflamatuar sitokinlerin salgılanmasının inhibisyonu başta olmak üzere birçok koruyucu ve onarıcı etki gösterebilmektedir (Coelho vd., 2007). Tedavi stratejilerini yönetebilmek ve kişiyeye özgü planlamaları geliştirebilmek için ilacın etkinliğini gösterecek kolay erişilebilir, kanda bakılan biyobelirteçlere olan ihtiyaç devam etmektedir.

miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen düzenlenmesinde görev alan, yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda, küçük, kodlamayan RNA dizilerdir. Tek bir miRNA'nın birden fazla hedefi olabileceği gibi tek bir mRNA da birden fazla miRNA tarafından hedeflenebilir. Bu mekanizma sayesinde miRNA'lar bağışıklık sistemi ve enflamatuar yanıtların oluşması gibi birçok biyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde görev alırlar (He & Hannon, 2004). Amacı immün sistem yanıtlarını baskılamak olan fingolimod gibi tedavi ajanlarının etkinliğinin takibi için miRNA ekspresyon seviyeleri klinikte takip edilebilir. Nitekim fingolimod tedavisi ile dolaşımdaki miRNA ekspresyon seviyelerinin ilişkisini inceleyen çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır.

Genetik polimorfizmler, toplumda %1'den fazla görülen genetik farklılıklardır. SNP'ler ise bu farklılığın tek bir nükleotitten kaynaklandığı durumlardır (Nelson vd., 2004). miRNA'ların genlerinde de bulunan SNP'ler bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerine, stabilitelere ve olgun miRNA oluşturma süreçlerine etki etmektedir (Iwai & Naraba, 2005). Değişen miRNA ekspresyon seviyeleri immün ve enflamatuar yanıtların farklı düzeylerde regölasyonu ile sonuçlanabilir. Bu yüzden SNP'lerin miRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin de araştırılması kritik bir öneme sahiptir. SNP'lerin varlığı toplumlar arasında fark gösterdiği gibi etnik köken, yaşam biçimi ve coğrafi faktörlerle de birleşerek hastalıklarla da ilişki göstermektedir. Bu

sebepten dolayı farklı toplumlarda çeşitli hastalıklarla ilişkili bulunan SNP'lere Türk toplumunda da bakılması büyük önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, enflamatuvar ve bağışıklık yanıtlarının oluşmasıyla ilişkili olan hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-196a-5p miRNA'larının dolaşımdaki ekspresyon seviyeleriyle bu miRNA'ların genlerinde bulunan SNP'lerin (rs2910164, rs767649, rs11614913) MS hastalığı riski ile ilişkisini inceleyerek, SNP'lerin miRNA plazma ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisinin, SNP'lerin Türk toplumunda MS'e yatkınlıktaki rolünün ve miRNA plazma ekspresyon seviyelerinin MS hastalığının teşhisi ve uygulanan tedavinin etkilerinin gözlemlenebilmesi için biyobelirteç olma potansiyellerinin değerlendirilmesidir. Bu çalışmada ilk defa bu miRNA'ların dolaşımdaki ekspresyon seviyeleri ile SNP'ler ve engellilik skorları arasındaki ilişkiler ve tedavinin etkileri incelenmiştir. Ayrıca bu miRNA genlerinde bulunan SNP'lerin MS hastalığıyla olan ilişkisi de Türk toplumunda ilk kez çalışılmıştır. 400 RRMS ve 400 kontrol katılımcısından oluşan genotipleme grubunda *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin RRMS hastalığı ve engellilik skorlarıyla; 30 naif (tedavi almayan) RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrol katılımcısının bulunduğu ekspresyon seviyesi grubunda da plazma hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin hastalık riski ve tedaviyle arasındaki ilişki incelenmiştir. Ayrıca SNP'lerin ve plazma rölatif ekspresyon seviyelerinin hastaların klinik bilgileriyle ilişkisi de incelenmiştir. Bu hedeflere ulaşmak için uygulanmış olan çalışma planı aşağıdaki gibidir:

- Kesin RRMS tanısı almış bireylerden ve kontrollerden genotipleme grubu için, bu grubun içinde bulunan bir kısım naif RRMS hastasından, fingolimod tedavisi alan RRMS hastasından ve kontrol grubu katılımcısından da ek olarak ekspresyon seviyesi grubu için tam kan örneklerinin alınması,
- Genotipleme çalışmaları için kullanılmak üzere alınmış olan tam kan örneklerinden laboratuvar ortamında manuel olarak tuzla çöktürme yöntemiyle genomik DNA izolasyonun gerçekleştirilmesi,
- İzole edilen DNA'lardan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time Polymerase Chain Reaction – RT-PCR) metoduyla rs2910164, rs767649 ve rs11614913 SNP'lerin genotiplerinin belirlenmesi,

- Ekspresyon seviyesi grubu için naif RRMS hastalarından, fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarından ve kontrol grubu katılımcılarından alınan tam kan örneklerinden iki saat içerisinde plazma ayrımının gerçekleştirilmesi,
- Elde edilen plazma örneklerinden RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi,
- RNA örneklerinden ters transkriptaz PCR metoduyla tamamlayıcı DNA (Complementary DNA – cDNA) sentezlenmesi,
- Sentezlenen cDNA'lar kullanılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (Quantitative Real Time PCR – qRT-PCR) metoduyla plazma hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi,
- SNP genotiplerinin ve alel frekanslarının RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırılıp bu SNP genotiplerinin MS hastalığına yatkınlıktaki rolünün ve hastalık riskiyle ilişkisinin incelenmesi,
- Plazma rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırılıp miRNA plazma ekspresyon seviyelerinin tedavi alma durumu ve hastalık riskiyle ilişkisinin incelenmesi,
- Hem genotipleme hem de ekspresyon seviyesi çalışması gerçekleştirilmiş örneklerle miRNA SNP'lerinin miRNA ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisinin incelenmesi,
- Çalışma gruplarına ait demografik bilgilerle ve klinik bulgularla, elde edilen deneysel sonuçların aralarındaki ilişkinin uygun istatistiksel analiz yöntemleri kullanılarak incelenmesi.

2. MATERYALLER VE METOTLAR

2.1 Çalışma Grupları ve Materyaller

2.1.1 Örnek gruplarının oluşturulması

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi 1 No.lu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı tarafından 01.12.2021 tarihinde oy birliğiyle etik açıdan uygun bulunan bu çalışmada miRNA genleri üzerinde bulunan genetik polimorfizmler MS hastalığında risk faktörü olarak incelenmiş, bu SNP'lerin plazmadaki miRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri ve plazma miRNA ekspresyon seviyelerinin tanı ve tedavide ayırıcı bir biyobelirteç olabilme potansiyeli değerlendirilmiş ve laboratuvar çalışmaları klinik kriterlere göre tek kör olarak gerçekleştirilmiştir (EK-1).

Bu tez kapsamında genetik polimorfizm ve plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. miRNA genleri üzerinde bulunan SNP'lerin incelenmesi için kesin RRMS tanısı almış 400 hasta ve 400 kontrol bireyin dâhil edildiği büyük bir çalışma popülasyonu oluşturulmuştur (Grup-1). Grup-1'deki katılımcıların genetik polimorfizm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Grup-1 içerisinde bulunan ve rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif (tedavi almayan) RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrol bireyin dâhil edildiği daha küçük bir grup oluşturulmuş ve Grup-2 olarak adlandırılan bu grupta plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2.1.1.1 Genetik polimorfizm çalışmaları için Grup-1 çalışma popülasyonunun oluşturulması

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi MS Polikliniği'ne başvuran, 2017 Revize McDonald Kriterleri doğrultusunda kesin MS tanısı almış ve RRMS klinik alt tipine sahip hastalar arasından aşağıda belirtilen dâhil edilme kriterlerine uyan gönüllü 400 birey Grup-1 içerisindeki hasta grubunu oluşturmuştur. Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Nöroloji Kliniği'ne başvurmuş fakat MS tanısı almayan ve diğer nörodejeneratif hastalık kaydı

bulunmayan gönüllü 400 kontrol birey de Grup-1 içerisindeki kontrol grubunu oluşturmuştur.

2017 Revize McDonald Kriterleri atak sayısı, lezyon sayısı, hastalık geçmişi ve dışlayıcı kriterler gibi tanı için gerekli bir dizi ilave verinin birlikte değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır ve bir önceki bölümde Çizelge 1.1’de detaylı bir şekilde verilmiştir. Grup-1’i oluşturan 400 RRMS hastası ve 400 kontrol birey çalışmaya dâhil edilme kriterlerinin tamamını karşılayıp, dâhil edilmeme kriterlerinin de tamamını dışlamıştır. Grup-1 için aranan dâhil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıdaki gibidir:

Hasta grubunda aranan dâhil edilme kriterleri:

- 18 yaşından büyük ve 65 yaşından küçük olması
- 2017 Revize McDonald Kriterleri doğrultusunda kesin MS tanısı almış olması
- RRMS klinik alt tipine sahip olması
- Çalışmaya katılmak için gönüllülük onayı vermiş olması

Kontrol grubunda aranan dâhil edilme kriterleri:

- 18 yaşından büyük ve 65 yaşından küçük olması
- Sahip olunan demografik özelliklerin hasta grubuyla benzer olması
- Hastalık geçmişinde MS ve diğer nörodejeneratif hastalık teşhisi ya da şüphesi bulunmuyor olması
- Çalışmaya katılmak için gönüllülük onayı vermiş olması

Hasta ve kontrol bireylerin dışlanma kriterleri:

- Serebrovasküler hastalığı olması
- Akut enfeksiyon (COVID-19 dâhil), ateşli hastalıklar veya travma geçirmiş olması
- Bilinen kötü huylu hastalığının olması
- Romatolojik veya diğer otoimmün hastalıklarının olması
- Kardiyovasküler olay veya kardiyovasküler cerrahi geçmişi olması
- Böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz, periton diyaliz veya böbrek transplantasyonu geçirmiş olması

2.1.1.2 Ekspresyon seviyesi çalışmaları için Grup-2 çalışma popülasyonunun oluşturulması

Grup-1 içerisinde bulunan ve rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrol birey Grup2'ye dâhil edilmiştir. Grup-2'deki katılımcıların plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Rastgele olarak belirlenen bu bireyler için de çalışmaya dâhil edilme ve dâhil edilmeme kriterleri bulunmaktadır. Grup-2'yi oluşturan katılımcılar çalışmaya dâhil edilme kriterlerinin tamamını karşılayıp, dâhil edilmeme kriterlerinin de tamamını dışlamıştır. Grup-2 için aranan dâhil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıdaki gibidir:

Naif hastalarda aranan dâhil edilme kriterleri:

- 18 yaşından büyük ve 65 yaşından küçük olması
- 2017 Revize McDonald Kriterleri doğrultusunda kesin MS tanısı almış olması
- RRMS klinik alt tipine sahip olması
- Daha önce MS tedavisi almamış olması
- Son 3 ayda immün-düzenleyici ve immün-baskılayıcı ilaç kullanmamış olması
- Son 1 ayda atak geçirmemiş olması
- Herhangi bir atak semptomu göstermemesi
- Çalışmaya katılmak için gönüllülük onayı vermiş olması

Fingolimod tedavisi alan hastalar için çalışmaya dâhil edilme kriterleri:

- 18 yaşından büyük ve 65 yaşından küçük olması
- 2017 Revize McDonald Kriterleri doğrultusunda kesin MS tanısı almış olması
- RRMS klinik alt tipine sahip olması
- Fingolimod tedavisi kullanıyor olması
- Son 1 ayda atak geçirmemiş olması
- Herhangi bir atak semptomu göstermemesi
- Çalışmaya katılmak için gönüllülük onayı vermiş olması

Kontrol grubu için çalışmaya dâhil edilme kriterleri:

- 18 yaşından büyük ve 65 yaşından küçük olması
- Sahip olunan demografik özelliklerin hasta grubuyla benzer olması
- Hastalık geçmişinde MS ve diğer nörodejeneratif hastalık teşhisi ya da şüphesi bulunmuyor olması
- Çalışmaya katılmak için gönüllülük onayı vermiş olması
- Son 3 ayda immün-düzenleyici ve immün-baskılayıcı ilaç kullanmamış olması

Hasta ve kontrol bireylerin dışlanma kriterleri:

- Serebrovasküler hastalığı olması
- Akut enfeksiyon (COVID-19 dâhil), ateşli hastalıklar veya travma geçirmiş olması
- Bilinen kötü huylu hastalığının olması
- Romatolojik veya diğer otoimmün hastalıklarının olması
- Kardiyovasküler olay veya kardiyovasküler cerrahi geçmişi olması
- Böbrek yetmezliği nedeniyle hemodiyaliz, periton diyaliz veya böbrek transplantasyonu geçirmiş olması

2.1.2 Laboratuvar çalışmaları için tam kan örneklerinin toplanması

2.1.2.1 Genetik polimorfizm çalışmalarının gerçekleştirileceği Grup-1 için tam kan örneklerinin toplanması

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi MS Polikliniği'ne başvuran, bölüm 2.1.1.1'de anlatılan çalışmaya dâhil edilme kriterlerinin tamamını sağlayan, dâhil edilmeme kriterlerinin de tamamını dışlayan, araştırmaya katılmaya gönüllü ve RRMS klinik altı tipine sahip 400 hasta ve MS tanısı almayan ve diğer nörodejeneratif hastalık kaydı bulunmayan 400 kontrol bireyden genetik polimorfizm çalışmalarının gerçekleştirilmesi için 3 mL Na-EDTA'lı tüplere tam kan örnekleri alınmıştır. Alınan kan örnekleri soğuk kutular içerisinde hastaneden Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi (TOBB ETÜ) Teknoloji Merkezi (TM) 202 no.lu laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonu deneyi gerçekleştirilene kadar -86 °C'de saklanmıştır.

2.1.2.2 Plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmalarının gerçekleştirileceği Grup-2 için tam kan örneklerinin toplanması

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi MS Polikliniği'ne başvuran, bölüm 2.1.1.2'de anlatılan çalışmaya dâhil edilme kriterlerinin tamamını sağlayan, dâhil edilmeme kriterlerinin de tamamını dışlayan, araştırmaya katılmaya gönüllü ve RRMS klinik altı tipine sahip 400 hasta ve MS tanısı almayan ve diğer nörodejeneratif hastalık kaydı bulunmayan 400 kontrol birey arasından rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrol bireyden plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmalarının gerçekleştirilmesi için 10 mL 2 adet Na-EDTA'lı tüplere tam kan örnekleri alınmıştır. Katılımcılardan alınan tam kan örnekleri en çok 2 saat içerisinde soğuk kutularla hastaneden TOBB ETÜ TM 202 no.lu laboratuvara getirilmiş ve soğutmalı santrifüj cihazında +4 °C'de santrifüj edilerek plazma fazları elde edilmiştir. Elde edilen plazma fazı biyogüvenlik kabininde DNaz ve RNaz içermeyen 2 mL tüplerde alikotlanarak bir sonraki deneysel çalışmaya kadar -86 °C'de saklanmıştır. Santrifüj işlemi Hettich Universal 320R (Tuttingen, Almanya) soğutmalı santrifüj cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Plazma ayırımından önce santrifüj cihazı ve biyogüvenlik kabini %70'lik etanol ile dezenfekte edilmiş ve RNase away solüsyonuyla silinmiştir. Plazma örnekleri tekrar tekrar dondurulup çözündürülmemek için tek kullanımlık hacimler şeklinde alikotlanmış, çözündürülüp kullanılan bir alikot saklanmak üzere tekrar dondurulmamıştır.

2.1.3 Laboratuvar çalışmalarında kullanılan malzemeler

Bu tez çalışmasının laboratuvar çalışmalarında kullanılan malzemelerin üretim yerleri ve üretici firmalarıyla ilgili bilgileri EK-2'de bir liste halinde verilmiştir. Kullanılan malzemelerin tez çalışması kapsamında planlanan laboratuvar çalışmalarında kullanılmaya elverişli ürünler olmasına dikkat edilmiştir.

2.1.4 Laboratuvar çalışmalarında kullanılan cihazlar

Bu tez çalışmasının laboratuvar çalışmalarında kullanılan malzemelerin üretim yerleri ve üretici firmalarıyla ilgili bilgileri EK-3'te bir liste halinde verilmiştir.

2.1.5 Prob ve primer dizileri

2.1.5.1 Genetik polimorfizm çalışmalarında kullanılan problemler ve primerler

RT-PCR metodu ile gerçekleştirilen *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin genotiplendirme çalışmaları için TaqMan SNP Genotyping Assay (Thermo Fisher, ABD) kitleri kullanılmıştır. TaqMan genotiplendirme kitlerinin içerisinde SNP'nin bulunduğu bölgeyi hedefleyen üretici firma tarafından valide edilmiş primerler ve SNP'nin her iki aleline özgü problemler bulunmaktadır. Kitler üretici firma tarafından fonksiyonel olarak test edilmiştir. Üretici firma tarafından primer dizileri paylaşılmayan TaqMan SNP genotiplendirme kitlerine özgü ID numaraları ve prob dizileri Çizelge 2.1 ve 2.2'de verilmiştir (URL-9, URL-10 ve URL-11).

Çizelge 2.1: TaqMan SNP genotiplendirme kitlerine ait bilgiler.

Gen	SNP	TaqMan Assay ID	Üretici
<i>MIR146A</i>	rs2910164 G/C	C__15946974_10	Thermo Fisher, ABD
<i>MIR155</i>	rs767649 T/A	C__2212229_10	
<i>MIR196A2</i>	rs11614913 C/T	C__31185852_10	

Çizelge 2.2: TaqMan SNP genotiplendirme kitlerinin prob dizileri.

SNP	Prob Dizisi	Kat. No
rs2910164	CATGGGTTGTGTCAGTGTCTGACCT[C/G]TGAAATTCAGTTCT TCAGCTGGGAT	4351379
rs767649	ATATAACACATTATCAAAAACACTG[A/T]CACTTTTCTGAGTG CTCTAATCAGG	
rs11614913	TTTTGAACTCGGCAACAAGAACTG[C/T]CTGAGTTACATCA GTCGGTTTTTCGT	

2.1.5.2 Plazma miRNA ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primerler

qRT-PCR metodu ile plazmadaki miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p ekspresyon seviyesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışması için üç hedef miRNA (hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-196a-5p), endojen referans miRNA (hsa-miR-16-5p) ve spike-in kontrol (UniSp6) için kullanımı uygun olan miRCURY LNA miRNA PCR Assay (Qiagen, Almanya) primerleri kullanılmıştır. Plazma ekspresyon seviyesi belirlenen hedef ve kontrol miRNA olgun dizileri ve kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3: Ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primer bilgileri.

miRNA	Kat. No	Üretici	Olgun miRNA Dizisi	Katalog Kimliği
hsa-miR-146a-5p	339306	Qiagen, Almanya	5'UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	YP00204688
hsa-miR-155-5p			5'UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGG	YP02119311
hsa-miR-196a-5p			5'UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG	YP00204386
hsa-miR-16-5p			5'UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	YP00205702
UniSp6			5'CUAGUCCGAUCAAGUCUUCGA	YP00203954

2.2 Laboratuvar Çalışmaları İçin Kullanılan Metotlar

2.2.1 Genotiplerin belirlenmesi için gerçekleştirilen çalışmalar

2.2.1.1 Tam kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu

Genotiplerin belirlenmesi için Lahiri ve Schnabel'in tarif ettiği manuel olarak tuzla çöktürme yöntemi ile tam kan örneklerinden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Lahiri & Schnabel, 1993). Tam kan numunesinden 750 µL alınarak 2 mL'lik DNaz/RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine eklenmiş ve üzerine eşit hacimde (750 µL) TKM tamponu (10 mM Trizma bazı, 10mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2mM EDTA.H₂O; pH=7.6) ilave edilerek seyreltilmiştir. Homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra bu karışımın içerisine 20 µL Triton X-100 eklenmiş ve tüpler kapağı kapalı olarak birkaç kez alt üst edilmiştir. 10 dk boyunca 1000 g'de sabit açılı rotora sahip santrifüj cihazında santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmış ve peletin üzerine 750 µL TKM eklenerek pelet iyice çözdürülmüştür. Pelet çözdürülüp tüpün içinde homojen bir görüntü elde edildikten sonra santrifüj işlemi aynı koşullar altında tekrar edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan pelette görünür bir kırmızılık kalmayana kadar bu işlemler tekrar edilmiştir. Beyaz bir pelet elde edildikten sonra peletin üzerine 200 µL TKM tamponu eklenmiş ve pelet tampon çözelti içerisinde iyice çözdürülmüştür. Ardından tüpe 10 µL %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışım kuru blok üzerinde 10 dk boyunca 58 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda karışımın içerisine soğuk ve doymuş NaCl çözeltisinden 75 µL eklenmiş, tüpler kapağı kapalı bir şekilde birkaç kez alt üst edilmiş ve +4 °C'de 10 dk boyunca 14000 g'de santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj işleminden

sonra tüplerde oluşan faz farkının kaybolmamasına dikkat edilerek ve dipte oluşan peleti bozmayacak şekilde süpernatanttan yaklaşık olarak 300 µL alınıp yeni bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Yeni tüpe, aktarılan süpernatant hacminin iki katı kadar soğuk etanol eklenmiş ve tüpün birkaç kez hızlı bir şekilde alt üst edilmesiyle DNA'nın presipitasyonu sağlanmıştır. Ardından -20 °C'de 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra pelet olarak genomik DNA eldesi için tüpler +4 °C'de 10 dk boyunca 10000 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış ve tüplerin içerisinde kalan etanolün buharlaşarak ortamdan uzaklaşması için tüpler kapağı açık bir şekilde oda sıcaklığında bir süre bekletilmiştir. Elde edilen pelet 100 µL Tris-EDTA (TE; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA.H₂O; pH=8.0) tamponunda homojen bir görüntü elde edilene dek çözündürülmüştür. Kuru blok üzerinde 37 °C'de 3 saatten daha uzun olacak sürede inkübe edilmiştir. İnkübasyonunun süresi tamamlandıktan sonra elde edilen genomik DNA'lar kalitatif ve kantitatif analizlerinin gerçekleştirilmesi için +4 °C'de bir süre bekletilmiştir.

2.2.1.2 Genomik DNA'nın kalitesinin ve konsantrasyonun ölçülmesi

Manuel olarak tuzla çöktürme yöntemi ile izole edilmiş olan genomik DNA'nın kalitatif ve kantitatif analizi Thermo Scientific NanoDropTM One Microvolume UV-Vis spektrofotometresi (Wisconsin, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm işlemine başlamadan önce cihazın pedalları distile su yardımıyla temizlenmiş ve DNA peletinin çözündürüldüğü çözücü olan TE tamponuyla kör (blank) ölçümü alınmıştır. Blank ölçümü alındıktan sonra cihazın alt pedalına 2 µL genomik DNA örneği yüklenerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. Cihaz sahip olduğu yazılım sayesinde 230, 260 ve 280 nm'de otomatik olarak ölçümler alarak DNA'nın konsantrasyonunu Beer-Lambert yasası üzerinden hesaplamaktadır. Genomik DNA'nın kantitatif analizi gerçekleştirilirken aynı zamanda cihaz tarafından safsızlık oranı da belirlenmektedir. Gerekli saflıkta bir DNA için A260/A280 oranının yaklaşık 1.8 civarlarında olması gerekmektedir. Bu oran 1.8'den daha düşük ise protein kontaminasyonu, 1.8'den yüksek ise RNA kontaminasyonu olduğunu ifade etmektedir (Lucena-Aguilar vd., 2016). Ölçümler sonucunda miktarı ve saflık durumu uygun olan numuneler daha sonraki deneysel süreçlerde kullanılabilecek -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.2 *MIR146A* rs2910164 G/C, *MIR155* rs767649 T/A ve *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'lerinin genotipleme çalışmaları

MIR146A rs2910164 G/C, *MIR155* rs767649 T/A ve *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'lerinin genotipleme çalışmaları için RT-PCR cihazında alele özgü TaqMan genotipleme kitleri kullanılmıştır. TaqMan genotipleme kitlerinin içerisinde SNP'nin bulunduğu bölgeyi hedefleyen primerler ve SNP'nin her iki aleline özgü prob lar bulunmaktadır. Kullanılan SNP genotipleme kitlerinin üretim yerleri, prob dizileri ve katalog numaraları Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de verilmiştir. Kitler üretici firma tarafından fonksiyonel olarak test edilmiştir.

RT-PCR cihazları ile gerçekleştirilen ve TaqMan problemlerinin kullanıldığı bu genotipleme yönteminde tek bir kuyucuk içerisinde PCR reaksiyonu gerçekleşirken genotipleme işlemi de gerçekleşmektedir. Reaksiyon içeriğinde Çizelge 2.4'te gösterildiği gibi genotipleme ana karışımı, genotipleme kiti ve izole edilmiş genomik DNA bulunmaktadır.

Çizelge 2.4: RT-PCR reaksiyon içeriği.

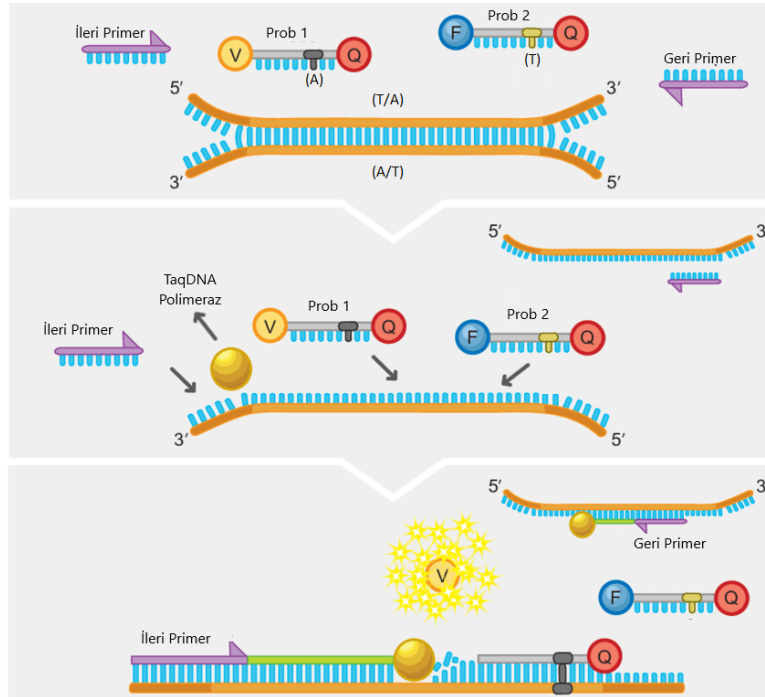
İçerik	1 Tüp
2X Ampigene Prob Ana Karışımı	5 µL
20X TaqMan SNP Genotipleme Kiti	0.5 µL
Genomik DNA	4.5 µL
Toplam	10 µL

Genotipleme ana karışımı için ENZO marka AMPIGENE qPCR Prob Ana Karışımı kullanılmıştır (Lausen, İsviçre). Ana karışım içerisinde ROX pasif referans boyası, reaksiyonu gerçekleştirecek olan DNA polimeraz enzimi, dNTP'ler ve tampon çözelti bulunmaktadır. TaqMan Genotipleme Kitleri, SNP'nin bulunduğu bölgeyi hedefleyen primerleri ve SNP'nin her iki aleline de özgü olan iki farklı tipte prob içermektedir. Yabancıl tip alel ile problemlardan bir tanesi eşleşirken polimorfik alel ile diğer prob eşleşmektedir. SNP'nin alellerine özgü olan bu problemler 5' ucunda birbirlerinden farklı olarak ya FAM ya da VIC floresan işaretçilerine sahiptir. Her iki floresan işaretçi de farklı bir dalga boyunda ışıma yapmaktadır. Farklı dalga boylarında gerçekleştirilen ışıma sayesinde alel spesifik olarak genotipler belirlenmektedir. Genetik polimorfizm çalışmalarında kullanılan genotipleme kitlerinin FAM ve VIC floresan işaretçilerinin temsil ettiği aleller Çizelge 2.5'te verilmiştir.

Çizelge 2.5: SNP'lerin FAM ve VIC floresan işaretçilerinin temsil ettiği aleller.

SNP	FAM	VIC
rs2910164 G/C	G	C
rs767649 T/A	T	A
rs11614913 C/T	T	C

TaqMan problemleri, SNP'nin bulunduğu bölgeye özgü olarak bağlanabilen spesifik tamamlayıcı dizilere sahip oligonükleotitlerdir. Her bir probun 5' ucunda diğerinden farklı bir dalga boyunda ışımaya yapan floresan işaretçi (reporter) ve 3' ucunda bu floresan işaretçiyi sönmüleyici bir molekül (quencher) bulunur. Floresan işaretçiler belirli dalga boylarında ışımaya yapabilirler ancak yakınlarında bulunan sönmüleyici molekül bu ışımayı sönmülemektedir. TaqMan problemlerinin kullanıldığı RT-PCR reaksiyonunda ilk olarak denatürasyon aşaması gerçekleşir. Daha sonra gerçekleşen bağlanma aşamasında bölgeye ileri ve geri primerler ve SNP'yi içeren diziyeye de SNP'nin alellerine özgü TaqMan problemleri bağlanmaktadır. SNP'nin yabancıl ve polimorfik tip aleline göre farklı floresan işaretçiye sahip prob bölgeye bağlanmaktadır. Uzama aşamasında ise ekzonükleaz aktivitesi gösteren DNA polimeraz sönmüleyici molekülü probdan ayırır. Bu sayede sönmüleyicisinden ayrılan floresan işaretçi ışımaya yapmaya başlar (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: TaqMan problemlerinin çalışma mekanizması.

Gerçekleşen her bir döngüden sonra ortamdaki floresan işaretçinin yaydığı sinyal ölçülerek kaydedilir. PCR döngüsü tamamlandıktan sonra ortamdaki floresan sinyali ölçülerek çalışılan örneklerin genotipleri RT-PCR cihazının sahip olduğu yazılım tarafından otomatik olarak belirlenmektedir. Genotipler sinyal tek bir floresan işaretçiden gelirse homozigot yabanıl veya polimorfik, her iki işaretçiden de gelirse heterozigot olarak belirlenmektedir. Cihaz yazılımı tarafından oluşturulan alelik dağılım haritasında da tüm örnekler bir arada görüntülenebilmektedir. Bu haritanın eksenlerini SNP'nin alelleri oluşturmaktadır. X eksen FAM boyasından gelen sinyalin pasif referans boyadan (ROX) gelen sinyale göre normalize edilmiş sinyal yoğunluğuna; Y eksen ise VIC boyasından gelen sinyalin ROX boyasından gelen sinyale göre normalize edilmiş sinyal yoğunluğuna karşılık gelmektedir. Böylelikle homozigot yabanıl ve polimorfik tipe sahip olan örnekler eksenlere yakın olacak şekilde dağılırken heterozigot tipe sahip örnekler ise grafiğin orta kısmında dağılım göstermektedir.

2.2.2.1 *MIR146A* rs2910164 G/C için genotipleme

MIR146A rs2910164 G/C SNP'nin genotipleme çalışması için kullanılan TaqMan SNP genotipleme kitinin üretim yeri, prob dizisi ve katalog numarası Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de verilmiştir. Kit üretici firma tarafından fonksiyonel olarak test edilmiştir. Reaksiyon karışımı Çizelge 2.4'te gösterildiği gibi genotipleme ana karışımı, genotipleme kiti ve izole edilmiş genomik DNA'dan oluşmaktadır.

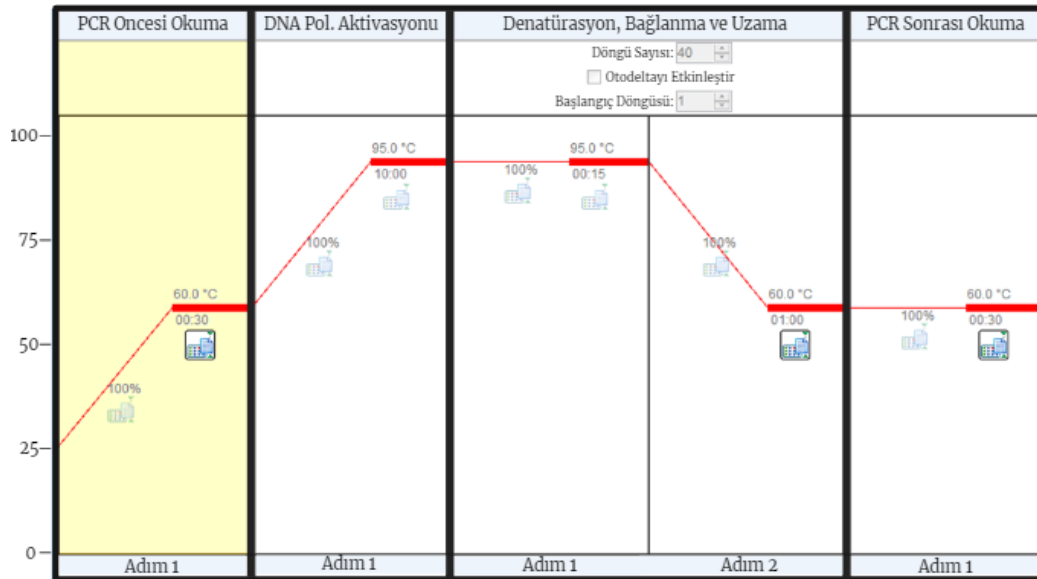
Genomik DNA örneklerinin farklı konsantrasyonlarda bulunması reaksiyon sonucunda elde edilen sinyal aralığını ve yoğunluğunu etkileyeceği için tüm örneklerin reaksiyona girmeden önce konsantrasyonlarının eşitlenmesi gerekmektedir. Bu yüzden genotipleme çalışmasına başlamadan önce tüm DNA örnekleri steril su ile seyreltilmiştir. Son konsantrasyon kit üreticisinin önerdiği reaksiyon hacmi (4.5 µL) ve genomik DNA miktarına (1-20 ng aralığında) göre hesaplanmıştır. Her bir örnek için 8 ng genomik DNA kullanılmasına karar verilmiş, genotipleme çalışması 1.8 ng/µL sabit konsantrasyon ile gerçekleştirilmiştir.

Toplam reaksiyon hacmi Çizelge 2.4'te 1 tüp için verilen reaksiyon içeriği hacimleri çalışılacak numune sayısı ile çarpılarak hesaplanmış ve steril 1.5 mL'lik tüpte hazırlanmıştır. Tüpün içerisine önce genotipleme ana karışımı daha sonra da TaqMan

SNP genotiplleme kiti eklenmiş ve vorteks yardımıyla homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra 96 kuyulu plakanın her bir kuyusuna eşit miktarda (5.5 µL) dağıtılmıştır. Plakanın yüklemesi buz üzerinde yapılmış ve reaksiyon karışımının ışıktan etkilenmemesi için 1.5 mL’lik tüp alüminyum folyo ile sarılmıştır. Plakanın kuyucuklarına reaksiyon karışımı dağıtıldıktan sonra son kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 4.5 µL seyreltilmiş genomik DNA örnekleri yüklenmiştir. Son kuyucuğa negatif kontrol (Negative template control – NTC) olması amacıyla genomik DNA örneği yerine steril su eklenmiştir. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra plakanın üst yüzeyi optik yapışkan bir koruyucu (seal) ile kapatılmıştır. Kapatma işlemi yapılırken şeffaf koruyucu yüzeye dokunulmamasına dikkat edilmiştir. Ardından plakalar +4 °C’de 2 dk boyunca 550 g’de (2000 rpm) santrifüjlenmiştir. Daha sonra plaka StepOne Plus RT-PCR cihazına (Woodlands, Singapur) yerleştirilmiş, cihazın yazılımı olan StepOne SoftWare 2.3 üzerinde Çizelge 2.6’da verilen reaksiyon döngüsü kurulmuş ve başlatılmıştır (Şekil 2.2).

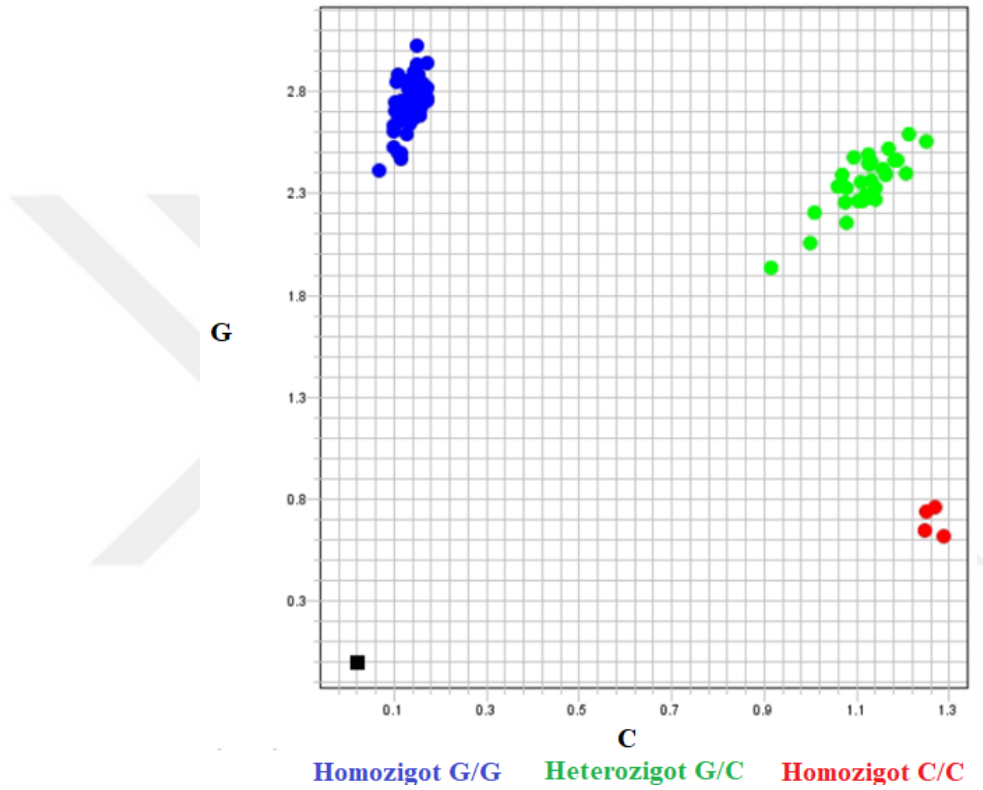
Çizelge 2.6: Genotiplleme çalışması için kurulan reaksiyon döngüsü.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
PCR Öncesi Okuma	60 °C	30 saniye	Tek Adım
DNA Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	10 dk	Tek Adım
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	40 Döngü
Bağlanma ve Uzama	60 °C	1 dk	
PCR Sonrası Okuma	60 °C	30 saniye	Tek Adım



Şekil 2.2: Genotiplleme çalışması için RT-PCR cihazında kurulan program.

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra floresan işaretçilerden gelen sinyallere göre numunelerin genotipleri yazılım tarafından otomatik olarak belirlenmektedir. Homozigot yabanıl tip (GG) genotipine sahip örneklerde FAM boyası sinyal verirken homozigot polimorfik tip (CC) genotipine sahip örneklerde VIC boyası sinyal vermektedir. Heterozigot (GC) genotipine sahip örneklerde ise hem FAM hem VIC boyası sinyal vermektedir. Şekil 2.3'te numunelerden gelen sinyal yoğunluğuna göre yazılım tarafından otomatik olarak oluşturulan alelik dağılım haritası verilmiştir.



Şekil 2.3: rs2910164 G/C SNP'sine ait RT-PCR sonucunda elde edilen alelik dağılım haritası.

MIR146A rs2910164 G/C SNP'si için oluşturulan alelik dağılım haritasında dikey eksen G aleline, yatay eksen ise C aleline karşılık gelmektedir. Dikey eksene yakın bir şekilde birikmiş olan mavi daireler GG genotipine, yatay eksene yakın bir şekilde birikmiş olan kırmızı daireler CC genotipine ve eksenlerin ortasında biriken yeşil daireler ise GC genotipine sahip bireyleri ifade etmektedir. Haritanın başlangıç noktasının yakınlarında bulunan siyah kare ise NTC'ye karşılık gelmektedir ve sinyal alınmamış olması reaksiyon karışımında herhangi bir kirlilik durumuna rastlanılmadığını ifade etmektedir.

2.2.2.2 *MIR155* rs767649 T/A için genotipleme

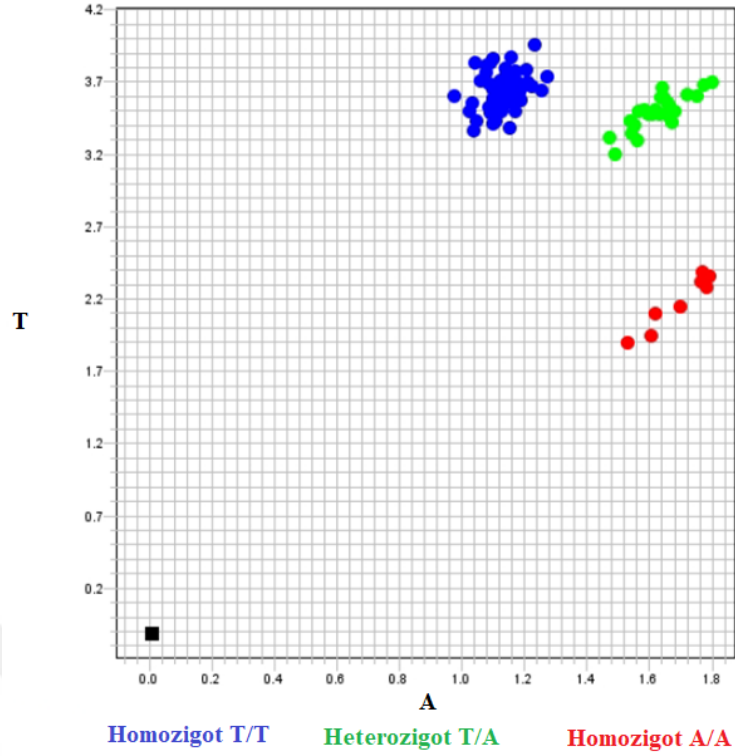
MIR155 rs767649 T/A SNP'nin genotipleme çalışması için kullanılan TaqMan SNP genotipleme kitinin üretim yeri, prob dizisi ve katalog numarası Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de verilmiştir. Kit üretici firma tarafından fonksiyonel olarak test edilmiştir. Reaksiyon karışımı Çizelge 2.4'te gösterildiği gibi genotipleme ana karışımı, genotipleme kiti ve izole edilmiş genomik DNA'dan oluşmaktadır.

Çalışmada kullanılacak olan genomik DNA'ların farklı konsantrasyonlarda olması durumunda karşılaşılabilecek problemler, hangi yönergeler doğrultusunda ne şekilde seyreltildiği bölüm 2.2.2.1'de anlatılmıştır. *MIR155* rs767649 T/A SNP'si genotipleme çalışmaları için de daha önceden seyreltilmiş ve konsantrasyonları eşitlenmiş genomik DNA örnekleri kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımı hazırlığı ve 96 kuyucuklu plaka yüklemesi bölüm 2.2.2.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yüklemesi tamamlanan plaka RT-PCR cihazına yerleştirilmiş, yazılım üzerinden Çizelge 2.6'da verilen reaksiyon döngüsü kurulmuş ve başlatılmıştır (Şekil 2.2).

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra floresan işaretçilerden gelen sinyallere göre numunelerin genotipleri yazılım tarafından otomatik olarak belirlenmektedir. Homozigot yabanıl tip (TT) genotipine sahip örneklerde FAM boyası sinyal verirken homozigot polimorfik tip (AA) genotipine sahip örneklerde VIC boyası sinyal vermektedir. Heterozigot (TA) genotipine sahip örneklerde ise hem FAM hem VIC boyası sinyal vermektedir. Şekil 2.4'te numunelerden gelen sinyal yoğunluğuna göre yazılım tarafından otomatik olarak oluşturulan alelik dağılım haritası verilmiştir.

MIR155 rs767649 T/A SNP'si için oluşturulan alelik dağılım haritasında dikey eksen T aleline, yatay eksen ise A aleline karşılık gelmektedir. Dikey eksene yakın bir şekilde birikmiş olan mavi daireler TT genotipine, yatay eksene yakın bir şekilde birikmiş olan kırmızı daireler AA genotipine ve eksenlerin ortasında biriken yeşil daireler ise TA genotipine sahip bireyleri ifade etmektedir. Haritanın başlangıç noktasının yakınlarında bulunan siyah kare ise NTC'ye karşılık gelmektedir ve sinyal alınmamış olması reaksiyon karışımında herhangi bir kirlilik durumuna rastlanılmadığını ifade etmektedir.



Şekil 2.4: rs767649 T/A SNP'sine ait RT-PCR sonucunda elde edilen alelik dağılım haritası.

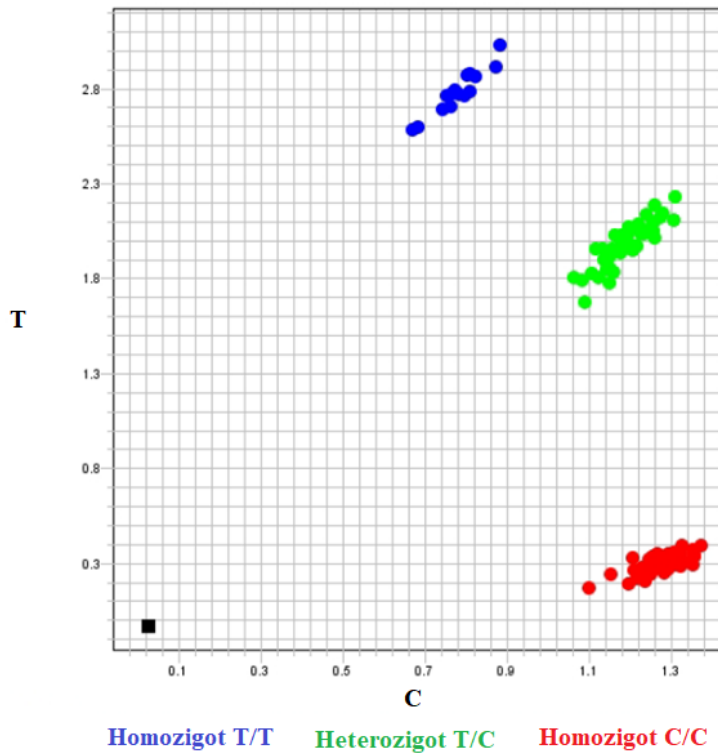
2.2.2.3 *MIR196A2* rs11614913 C/T için genotipleme

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'nin genotipleme çalışması için kullanılan TaqMan SNP genotipleme kitinin üretim yeri, prob dizisi ve katalog numarası Çizelge 2.1 ve Çizelge 2.2'de verilmiştir. Kit üretici firma tarafından fonksiyonel olarak test edilmiştir. Reaksiyon karışımı Çizelge 2.4'te gösterildiği gibi genotipleme ana karışımı, genotipleme kiti ve izole edilmiş genomik DNA'dan oluşmaktadır.

Çalışmada kullanılacak olan genomik DNA'ların farklı konsantrasyonlarda olması durumunda karşılaşılabilecek problemler, hangi yönergeler doğrultusunda ne şekilde seyreltildiği bölüm 2.2.2.1'de anlatılmıştır. *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'si genotipleme çalışmaları için de daha önceden seyreltilmiş ve konsantrasyonları eşitlenmiş genomik DNA örnekleri kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımı hazırlığı ve 96 kuyucuklu plaka yüklemesi bölüm 2.2.2.1'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra yüklemesi tamamlanan plaka RT-PCR cihazına yerleştirilmiş, yazılım üzerinden Çizelge 2.6'da verilen reaksiyon döngüsü kurulmuş ve başlatılmıştır (Şekil 2.2).

PCR reaksiyonu tamamlandıktan sonra floresan işaretçilerden gelen sinyallere göre numunelerin genotipleri yazılım tarafından otomatik olarak belirlenmektedir. Homozigot yabanıl tip (CC) genotipine sahip örneklerde VIC boyası sinyal verirken homozigot polimorfik tip (TT) genotipine sahip örneklerde FAM boyası sinyal vermektedir. Heterozigot (CT) genotipine sahip örneklerde ise hem VIC hem FAM boyası sinyal vermektedir. Şekil 2.5'te numunelerden gelen sinyal yoğunluğuna göre yazılım tarafından otomatik olarak oluşturulan alelik dağılım haritası verilmiştir.



Şekil 2.5: rs11614913 C/T SNP'sine ait RT-PCR sonucunda elde edilen alelik dağılım haritası.

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'si için oluşturulan alelik dağılım haritasında dikey eksen T aleline, yatay eksen ise C aleline karşılık gelmektedir. Dikey eksene yakın bir şekilde birikmiş olan mavi daireler TT genotipine, yatay eksene yakın bir şekilde birikmiş olan kırmızı daireler CC genotipine ve eksenlerin ortasında biriken yeşil daireler ise CT genotipine sahip bireyleri ifade etmektedir. Haritanın başlangıç noktasının yakınlarında bulunan siyah kare ise NTC'ye karşılık gelmektedir ve sinyal alınmamış olması reaksiyon karışımında herhangi bir kirlilik durumuna rastlanılmadığını ifade etmektedir.

2.2.3 Plazma miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için qRT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle naif RRMS hastalarından, fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarından ve kontrol grubu katılımcılarından alınan tam kan örneklerinden plazma ayırımı gerçekleştirilmiş, daha sonra elde edilen plazma numunelerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonu miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'ların kantitatif ve kalitatif analizi spektrofotometrik yöntemler ile gerçekleştirilmiş ve uygun olan örneklerden ters transkriptaz PCR metoduyla cDNA sentezlenmiştir. Plazmadan izole edilen total RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'lardan qRT-PCR metodu kullanılarak hedef miRNA'ların ve referans kontrolün ifade seviyeleri belirlenmiştir. qRT-PCR yönteminde örneklerden gelen sinyal miktarı ortamda oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artış göstermektedir ve cihaz tarafından ölçülmektedir. Bu çalışma grubunda sinyal sağlayıcısı olarak SYBR Green boyası kullanılmıştır. SYBR Green boyası çift zincirli DNA oluklarına yerleştiği zaman floresan sinyal veren bir floresan işaretçisidir. PCR reaksiyonu gerçekleştikçe ortamda hedef bölgenin miktarı artmakta ve artan çift zincirli DNA fragmentleriyle paralel olacak şekilde ölçülen sinyalin yoğunluğu da artış göstermektedir. Hedef miRNA'ların ifade seviyeleri referans miRNA'ya göre normalize edildikten sonra, ekspresyon seviyesi çalışması gerçekleştirilen her bir örneğin rölatif ekspresyon seviyesi Livak ve Schmittgen'in tarif ettiği $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak her bir hedef miRNA için ayrıca hesaplanmıştır (Livak & Schmittgen, 2001). $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak rölatif ekspresyon seviyesinin nasıl belirlendiği bölüm 2.2.3.5'te ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

2.2.3.1 Tam kan örneklerinden plazma eldesi

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi MS Polikliniği'nden alınan tam kan örnekleri en geç 2 saat içerisinde, hemolizin ve bozulmanın önlenmesi için soğuk kutularda sabitlenmiş bir şekilde TOBB ETÜ TM 202 no.lu laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirildikten sonra 10 mL'lik 2 adet EDTA'lı tüpte bulunan tam kan örnekleri +4 °C'de 10 dk boyunca 1900 g'de santrifüj edilmiştir. Bu şekilde tam kandan elde edilen plazma fazları biyogüvenlik kabini içerisinde 2 mL'lik DNaz/RNaz içermeyen

mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve saflaştırılmak için +4 °C’de 10 dk boyunca 16000 g’de bir kez daha santrifüj edilmiştir. Daha sonra plazma örnekleri tek seferde kullanılacak hacimlerde alikotlanarak RNA izolasyonu çalışmalarına kadar -86 °C’de saklanmıştır.

2.2.3.2 Plazmalardan total RNA izolasyonu

Bir önceki bölümde tarif edildiği gibi elde edilen plazma örneklerinden kolon bazlı bir metoda sahip olan miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA izolasyonu için kit üreticisinin önerdiği ve laboratuvarımızda modifiye edilerek optimize edilen prosedür uygulanmıştır. Kit kullanım kılavuzunda da önerildiği üzere 200 µL plazma örneği oda sıcaklığında çözündürülüp birkaç kez alt üst edildikten sonra 2 mL’lik DNaz/RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. Plazma numunesinin içerisine RNA’ların çökmesine yardımcı olan ve kısa uzunlukta ya da düşük miktarda RNA içeren örneklerle yapılan çalışmalarda kullanılan carrier RNA’dan 1.9 µL eklenmiş ve tüp hafifçe karıştırılmıştır. Daha sonra tüpün içindeki hacmin 5 katı (1000 µL) kadar Qiazol eklenmiştir. Homojen bir görüntü elde edilene dek tüpler vorteks yardımıyla ve el ile alt üst edilerek iyice karıştırılmıştır. Ardından faz ayrımının sağlanması için tüpün içerisine 300 µL kloroform eklenmiş, oluşan karışım vorteks yardımıyla ve el ile alt üst edilerek, yaklaşık 10 dk boyunca, tüpün içerisinde homojen bir görüntü elde edilene kadar iyice karıştırılmıştır. Homojen bir görüntü elde edildikten sonra soğutmalı santrifüj cihazında +4 °C’de 15 dk boyunca 12000 g’de santrifüj edilerek tüp içerisinde faz ayrımı sağlanmıştır. Fazlarına ayrılmış karışımın en üstünde bulunan berrak süpernatant fazından dikkatli bir şekilde yaklaşık 600 µL alınmış ve yeni bir 2 mL’lik DNaz/RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Ayrılan bu süpernatant hacminin içerisine spike-in olarak kullanılacak olan sentetik UniSp6’dan 3.5 µL, tüp içerisindeki hacmin 1.5 katı (900 µL) kadar da saf etanol eklenmiş ve tüp birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra tüpün içindeki hacimden 700 µL’yi geçmeyecek şekilde bir miktar karışım alınarak miRNeasy MinElute Spin Column tüpüne aktarılmış ve kolonlu tüpler oda sıcaklığında 15 saniye boyunca 8000 g’de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken atık sıvı atığa dökülmüştür. Saf etanolla karıştırılan süpernatant karışımı bitene kadar aynı kolonlu tüp için bu aşama tekrar edilmiştir. Ardından yıkama işlemi için kolona kit içeriğinde

bulunan RWT Buffer'dan 700 µL eklenmiş ve tüp oda sıcaklığında 15 saniye boyunca 8000 g'de santrifüj edilmiştir. Yine toplama tüpünün dibinde biriken atık sıvı atığa dökülmüş ve kolona kit içeriğinde bulunan RPE Buffer'dan 500 µL eklenerek aynı koşullar altında santrifüj edilmiştir. Daha sonra presipitasyon için kolona taze hazırlanmış %80'lik etanolden 700 µL eklenmiş ve tüp oda sıcaklığında 2 dk boyunca 8000 g'de santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünün dibinde biriken atık sıvı atığa döküldükten sonra bu işlem bir kez daha tekrar edilmiştir. İkinci santrifüjün sonunda kolonlu tüpün atık toplama tüpü de atılmış, yeni bir toplama tüpü takılmış ve kolona herhangi bir şey eklenmeden tüp oda sıcaklığında 5 dk boyunca 14100 g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolon 1.5 mL'lik yeni bir tüpe yerleştirilmiştir. Kolonun çeperlerine temas etmeden, direk merkezdeki filtre kısmına 16 µL DNaz/RNaz içermeyen saf su eklenmiş ve 5 dk inkübe edilmiştir. Inkübasyon tamamlandıktan sonra örnekler 1 dk boyunca 14100 g'de santrifüj edilmiştir. Bu işlem 1.5 mL'lik tüpün içerisinde biriken çözünmüş RNA'nın konsantrasyonunu arttırmak için bir kez daha tekrar edilmiştir. Tekrar edilirken kolona 1.5 mL'lik toplama tüpünde biriken sıvı eklenmiş, 5 dk boyunca inkübe edilmiş ve aynı koşullar altında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kolonlar atığa atılmış, izole edilen RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif analizlerinin gerçekleştirilmesi için buz kutularına yerleştirilmiştir.

2.2.3.3 Total RNA'nın kalitesinin ve konsantrasyonun ölçülmesi

Plazmadan kolon bazlı bir metoda sahip olan miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak izole edilen total RNA'nın kalitatif ve kantitatif analizi Thermo Scientific NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis spektrofotometresi (Wisconsin, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon bazlı kitler kullanılarak izole edilen RNA örnekleri içerisinde sık olarak guanidin, fenol ve EDTA gibi kimyasal ajanlardan veya protein kalıntılarından kaynaklan kontaminasyonlar görülmektedir. Safsızlığa neden olabilen bu ajanlar 230-280 nm dalga boyları arasında ve nükleik asitler ise 260 nm dalga boyunda maksimum absorbans değerine sahiptir. Cihaz hem izole edilen RNA'nın konsantrasyonunu hem de kalitesini belirlemek için bu aralığı kapsayacak şekilde ölçüm işlemini gerçekleştirmektedir. Ölçüm işlemine başlamadan önce cihazın pedalları distile su yardımıyla temizlenmiş ve RNA'nın çözdürüldüğü saf su ile blank ölçümü alınmıştır. Blank ölçümü alındıktan sonra RNA

örneklerinden 2 µL alınarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. RNA konsantrasyonları Beer-Lambert yasasına uygun bir şekilde cihaz tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Ölçüm sonucunda cihaz tarafından belirlenen kontaminasyonlar ve A260/280, A230/260 oranları dikkate alınmıştır. A260/280 oranı protein kontaminasyonu hakkında yorum yapılmasını sağlar ve yaklaşık 2.0 değerinde olması RNA örneklerinin protein kontaminasyonu bakımından temiz olduğunu gösterir. A260/230 oranı ise kimyasal kontaminasyonu hakkında yorum yapılmasını sağlar ve 2.0-2.2 aralığında olması RNA örneklerinin kimyasal kontaminasyonu bakımından temiz olduğunu gösterir (Lucena-Aguilar vd., 2016). Guanidin kontaminasyonu 100 mM'a kadar kabul edilmiş, guanidin kontaminasyonu 100 mM'ın üzerinde olan veya fenol kontaminasyonu bulunan örneklerin plazmadan total RNA izolasyonu tekrar edilmiştir. Ölçümler sonucunda miktarı ve saflık durumu uygun olan numuneler sonraki deneysel süreçlerde kullanılabilecek -86 °C'de saklanmıştır.

2.2.3.4 Ters transkriptaz PCR metodu ile cDNA sentezi

Konsantrasyonu ve kalitesi uygun RNA örneklerinden qRT-PCR yöntemi ile hedef miRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için çift zincirli cDNA elde edilmelidir. Bunun için ters transkriptaz PCR tekniği kullanılmıştır. Ters transkriptaz PCR yöntemi miRCURY LNA RT Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Deney prosedürü üretici markanın önerdiği protokole paralel olarak gerçekleştirilmiştir. Tüm örneklerin cDNA sentezi sabit miktarda (100 ng) RNA ile gerçekleştirilmiştir. Çizelge 2.7'de cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı içeriği ve karışımı oluşturan ürünlerin 1 tüp için gerekli olan miktarları verilmiştir.

Çizelge 2.7: cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon içeriği.

İçerik	1 Tüp
5X SYBR Green Tamponu	2.4 µL
10X miRCURY Ters Transkriptaz Enzimi	1.2 µL
DNaz/RNaz İçermeyen Su	Değişken
RNA (100 ng)	Değişken
Toplam	12 µL

Tüplere önce DNaz/RNaz içermeyen su eklenmiş, daha sonra reaksiyon karışımı Çizelge 2.7'de 1 tüp için verilen reaksiyon içeriği hacimlerinden çalışılacak numune sayısına göre toplam reaksiyon hacmi hesaplanarak, buz üzerinde ayrı bir tüpte

hazırlanmıştır. Oluşturulan reaksiyon karışımı vorteks ile hafifçe karıştırılmış ve her tüpe eşit hacimde (3.6 μ L) dağıtılmıştır. Daha sonra içerisinde su ve reaksiyon karışımı bulunan tüplere, su miktarının hesaplandığı örnek karşılık gelecek şekilde RNA örnekleri eklenmiştir. Hazırlanan tüpler vorteksle hafifçe karıştırılıp spin edildikten sonra Çizelge 2.8’de verilen program altında Eppendorf Mastercycler® Nexus PCR cihazına (Münih, Almanya) yerleştirilmiştir. Reaksiyon bitiminde cDNA’ler eşit hacimlerde alikotlanmış ve qRT-PCR çalışmasında kullanılabilecek -20 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 2.8: Ters transkripsiyon PCR için kurulan reaksiyon programı.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre
Ters transkripsiyon	42 °C	60 dk
Reaksiyonun sonlandırılması	95 °C	5 dk
Muhafaza koşulları	4 °C	---

2.2.3.5 mikroRNA’ların ekspresyon seviyelerinin kantitatif eş zamanlı PCR yöntemi ile belirlenmesi

Bu tez çalışmasında hasta ve kontrol gruplarında üç hedef miRNA olan hsa-miR-146a-5p, hsa-miR-155-5p ve hsa-miR-196a-5p’nin, endojen referans miRNA olan hsa-miR-16-5p’nin ve spike-in kontrol olan sentetik UniSp6’nın ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Bu çalışma miRCURY LNA miRNA SYBR Green PCR Kiti (Qiagen, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plazma ekspresyon seviyesi belirlenen hedef ve kontrol miRNA uygun dizileri ve kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 2.3’te verilmiştir.

qRT-PCR çalışması için kit üreticisinin önerdiği prosedür uygulanmıştır. İlk olarak daha önce sentezlenmiş ve alikotlanmış olan cDNA örnekleri 18 μ L saf su ile seyreltilmiştir. Daha sonra toplam reaksiyon hacmi Çizelge 2.9’da 1 tüp için verilen reaksiyon içeriği hacimleri çalışılacak numune sayısı ile çarpılarak hesaplanmış ve reaksiyon karışımı her bir miRNA için kendine özgü primerler kullanılarak buz üzerinde ayrı tüpler içerisinde hazırlanmıştır.

Reaksiyon karışımı daha önce oluşturulmuş olan plaka tasarımına göre 96 kuyucuklu plakanın kuyularına eşit hacimde (7 μ L) dağıtılmıştır. Daha sonra plaka tasarımına uygun olarak kuyucuklara 3 μ L seyreltilmiş cDNA’ler dublike şekilde yüklenmiştir.

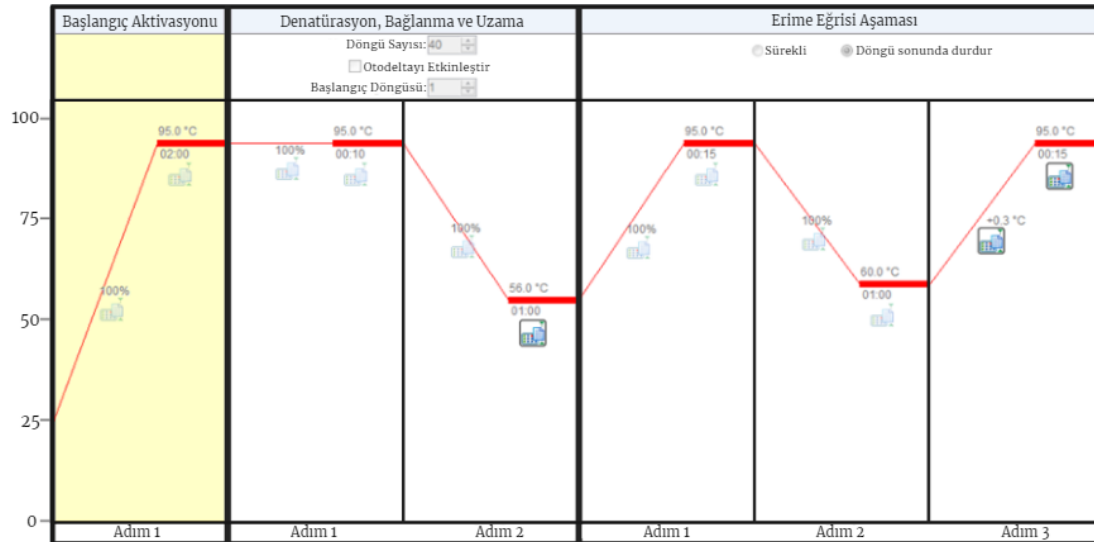
Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra plakanın üst yüzeyi seal ile kapatılmıştır. Kapatma işlemi yapılırken şeffaf koruyucu yüzeye dokunulmamasına dikkat edilmiştir. Ardından plakalar +4 °C’de 2 dk boyunca 550 g’de (2000 rpm) santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi tamamlanan plakalar StepOne Plus RT-PCR cihazına (Woodlands, Singapur) yerleştirilmiş, cihazın yazılımı olan StepOne SoftWare 2.3 üzerinde Çizelge 2.10’da verilen reaksiyon döngüsü kurulmuş ve başlatılmıştır (Şekil 2.6).

Çizelge 2.9: qRT-PCR reaksiyon içeriği.

İçerik	1 tüp
RNase/DNase içermeyen su	0.5 µL
ROX Boyası	0.5 µL
2X miRCURY SYBR Green Karışımı	5 µL
İleri ve Geri Primerler	1 µL
cDNA	3 µL
Toplam	10 µL

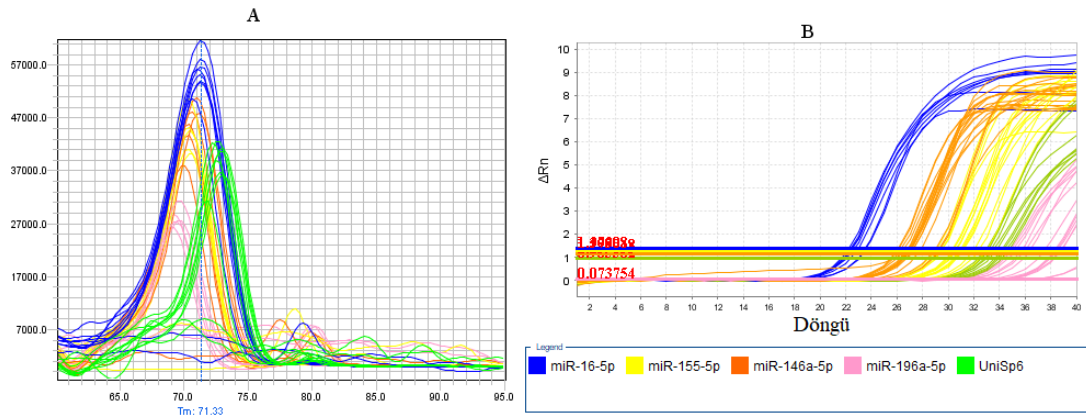
Çizelge 2.10: qRT-PCR için reaksiyon döngüsü programı.

Basamaklar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Aktivasyonu	95 °C	2 dk	Tek adım
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	40 Döngü
Bağlanma ve Uzama	56 °C	60 saniye	40 Döngü
Erime Eğrisi	60-95 °C	Her 0.3 °C’de bir	



Şekil 2.6: qRT-PCR için RT-PCR cihazında kurulan döngü programı.

qRT-PCR çalışması sonucunda reaksiyonu gerçekleştiren ürünlerin özgülüğünün değerlendirilebilmesi için erime eğrisi analizi gerçekleştirilmelidir. Bu yüzden her bir çalışmanın sonuna erime eğrisi analizleri eklenmiş ve 60-95 °C aralığında her 0.3 °C’de bir ölçüm alınarak oluşturulan eğime eğrisi grafiği oluşturulmuştur (Şekil 2.7). Reaksiyonu gerçekleştiren ürünlerin belirli bir derecede tek bir tepe noktasına sahip olması bu ürünlerin özgül olduğu anlamına gelmektedir. Erime eğrisi analizlerine göre qRT-PCR çalışması yapılan tüm numunelerin hedef ve kontrol miRNA’ları için özgül olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2.7: Ekspresyon seviyesi çalışmalarında kullanılan primerlerin erime eğrisi sonuçları (A) ve bu çalışmada elde edilen amplifikasyon eğrileri (B).

Reaksiyon gerçekleştikçe ürün miktarı ile orantılı olarak artan sinyal yoğunluğunun sabit bir değere ulaştığı döngü sayısına döngü eşiği (Cycle threshold – C_t) adı verilir. Her bir numunenin C_t değeri cihaz tarafından otomatik olarak tespit edilmiştir. Dublike olarak gerçekleştirilen çalışmalarda bir örneğin C_t değeri o örneğe ait C_t değerlerinin ortalamasıyla hesaplanmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarında bulunan tüm örneklerin C_t değerleri hesaplandıktan sonra her bir örneğin rölatif ekspresyon seviyesi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduna göre hesaplanmıştır. İlk olarak tüm gruplardaki örneklerin hedef miRNA C_t değerlerinden endojen referans miRNA’nın C_t değeri çıkarılmış ve her bir örnek için ΔC_t değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan ΔC_t değerlerinin kontrol grubu için ortalaması alınmıştır. Ardından naif RRMS ve fngolimod tedavisi alan RRMS hasta grubundaki her bir bireyin ΔC_t değerinden kontrol grubunun ortalama ΔC_t değeri çıkartılarak her örnek için $\Delta\Delta C_t$ değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan $\Delta\Delta C_t$ değerinin önce negatifi daha sonra da 2 tabanındaki üstel değeri alınarak örneklerin rölatif ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir (Livak & Schmittgen, 2001).

$$\Delta C_t = C_t (\text{Hedef miRNA}) - C_t (\text{Referans miRNA})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Hasta}) - \Delta C_t (\text{Kontrol ortalama})$$

$$\text{Rölatif Ekspresyon Seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

2.2.4 İstatistiksel ve *in silico* analizlerin gerçekleştirilmesi için kullanılan metotlar

Sürekli değişkenlerin (yaş, plazma miRNA ekspresyon seviyeleri, hastalık süresi, lipid parametreleri, D vitamini seviyeleri, vb.) normallik testleri gruplarda 25'ten fazla katılımcı olduğu için Kolmogorov-Smirnov testi ile yapılmıştır. Normallik testi sonucunda $P > .05$ olması o parametrenin incelendiği grupta normal dağılan bir parametre olduğunu göstermektedir (Aggarwal & Ranganathan, 2016). Normal dağılım gösteren parametrelerin ikili gruplar arası karşılaştırmalarında bağımsız örneklem t-testi, ikiden fazla grup arası karşılaştırmalarında ANOVA testleri kullanılmıştır. Levene varyans homojenite testi sonuçlarına göre grupların varyanslarının homojen dağıldığı durumda ($P > .05$) one-way ANOVA uygulanmış, anlamlı çıkan sonuçların post-hoc analizi Bonferroni testi ile gerçekleştirilmiştir. Varyansların homojen dağılmadığı durumda ise ($P < .05$) Welch ANOVA kullanılmış ve anlamlı çıkan sonuçların post-hoc analizi Games-Howell testi ile gerçekleştirilmiştir. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin ikili karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanılırken ikiden fazla grup arası karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Çoklu gruplar arası karşılaştırma sonuçları anlamlı çıkan parametrelerin ikili gruplar arası karşılaştırması için post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir (Meissinger & Bekey, 1966).

Cinsiyet, alel frekansı, genotipler, hızlı ve yavaş progresyon gibi kategorik değişkenlerin analizinde Pearson χ^2 testi kullanılmıştır. Genotip ve alel frekansı analizleri gerçekleştirilmeden önce hasta ve kontrol gruplarındaki gözlemlenen ve beklenen genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesine uyum gösterip göstermediği kontrol edilmiştir. Ardından olasılık oranı (Odds ratio – OR) ve güven aralığı (Confidence interval – CI), χ^2 testi ile de P değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca, alel frekansları ve genotipler SNPStat programında yaşa ve cinsiyete göre

düzenlenerek ve farklı genotip modelleri kurularak gruplar arasında karşılaştırılmış; yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiş OR, CI ve *P* değerleri hesaplanmıştır. Akaike bilgi ölçütü (Akaike information criterion – AIC) ve Bayesian bilgi ölçütü (Bayesian information criterion – BIC) değerlerine bakılarak bu genotip modelleri arasından en uygun genotip modeline karar verilmiştir (Chakrabarti & Jayanta, 2011).

Hasta ve kontrol grupları içerisinde normal dağılıma sahip sürekli değişkenlerin birbirleri ile olan ilişkileri Pearson korelasyon analizi ile incelenmiş ve Pearson korelasyon katsayısı (*r*) hesaplanmıştır. Normal dağılım göstermeyen sürekli değişkenlerin birbirleri ile olan ilişkileri Spearman korelasyon analizi ile incelenmiş ve Spearman korelasyon katsayısı (*p*) hesaplanmıştır. Demografik, klinik ve deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen parametrelerin hastalık riskiyle olan ilişkisini incelemek için Partial Least Squares (PLS) regresyon kullanılarak yalnız ve bir arada bulundukları farklı modeller kurulmuş ve lojistik regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Anlamlı çıkan parametrelerin tanısallık değerini test etmek için Receiver Operating Characteristics (ROC) eğrisi çizdirilmiş ve Area Under the Curve (AUC) değeri hesaplanmıştır. AUC değeri, bir tanı testinin hastaları ve sağlıklı bireyleri ayırmadaki doğruluk oranını göstermektedir. Çizelge 2.11’de gösterildiği gibi her bir sayısal aralık kullanılan parametrenin doğruluk oranı üzerinde sözel bir yorum yapılmasını sağlamaktadır. AUC değerine göre analizlere devam edilmiş, parametrenin hata matrisi oluşturulmuş; özgüllük, duyarlılık ve doğruluk yüzdeleri hesaplanmıştır. AUC değeri orta ve üzeri seviyelerde (orta, iyi veya çok iyi) olduğunda, duyarlılığın ve özgüllüğün en yüksek değerlerine sahip olduğu noktaya karşılık gelen Youden’s Index değeri hesaplanarak kesme değeri (cut-off) belirlenmiştir.

Çizelge 2.11: AUC değerlerine göre analizin başarı durumu değerlendirmesi

AUC	Değerlendirme
0.90-1.00	Çok iyi
0.80-0.90	İyi
0.70-0.80	Orta
0.60-0.70	Kötü
0.50-0.60	Başarısız

Bu bölümde anlatılan testlerde istatistiksel olarak elde edilen *P* değerinin anlamlılık sınırı $P < .05$ olarak belirlenmiş olup, SNP analizlerinde gerçekleştirilen çoklu testler nedeniyle anlamlılık sınırı $.05/n$ olarak yeniden ayarlanmıştır. Çoklu testlerin

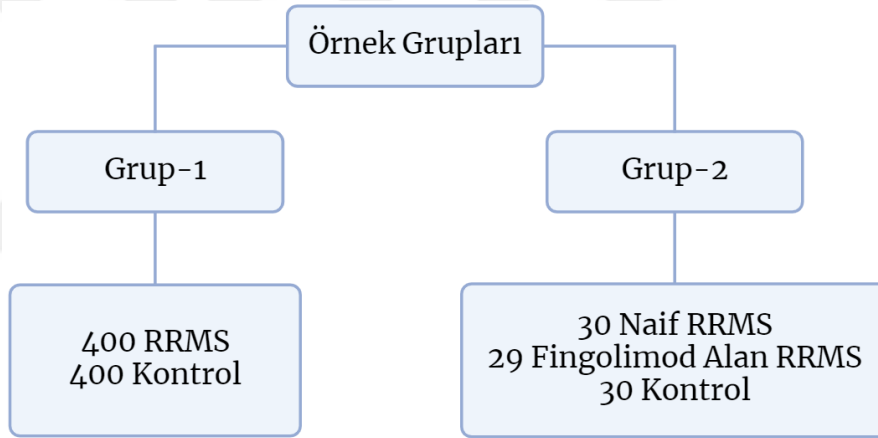
gerçekleştirildiği ve birden fazla hipotezin test edildiği diğer post-hoc sonuçları için ise anlamlılık değerinin yeniden ayarlanması için Bonferroni düzeltmesi yapılmış, anlamlılık değeri SPSS tarafından $\alpha \times n$ olarak hesaplanarak sunulmuştur ($\alpha=P$ değeri; n =gerçekleştirilen test sayısı). Analizler, IBM SPSS Statistics bilgisayar programının 28. versiyonunda gerçekleştirilmiştir.

miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin hedef genleriyle ve ortak olarak hedefledikleri genlerle olan ilişkilerinin incelendiği *in silico* analizler miRNET programı üzerinden ve KEGG veri tabanından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. miRNA'ların ilişkili olduğu hedef genler otoimmünite, nörodejenerasyon, TLR sinyal yolağı, T hücre proliferasyonu, B hücre proliferasyonu, doğal ve edinilmiş bağışıklık yanıtlarının oluşturulması gibi MS ile ilişkili yollarda görev alma durumlarına göre filtrelenmiş ve hipermetrik test sonuçları $P < .05$ olan genler analize dâhil edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Örnek Grupları

Bu tez çalışmasında genetik polimorfizm çalışmalarının gerçekleştirildiği 400 RRMS hastası ve 400 kontrolden oluşan Grup-1 ve Grup-1 içerisinde bulunan ve rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif (tedavi almayan) RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrolden oluşan ve ekspresyon seviyesi çalışmalarının gerçekleştirildiği Grup-2 olmak üzere iki örnek grubu oluşturulmuştur (Şekil 3.1). Örnek gruplarının oluşturulması bölüm 2.1.1’de detaylı bir şekilde anlatılmıştır.



Şekil 3.1: Tez çalışmasında oluşturulan örnek gruplarının özeti.

3.1.1 Grup-1’in demografik bilgileri

Grup-1’e dâhil edilen 400 RRMS hastası ve 400 kontrolden tam kan örnekleri alınmış, daha sonra bu örneklerin *MIR146A* rs2910164 G/C, *MIR155* rs767649 T/A ve *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP’leri için genotipleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Grup-1 çalışma grubunu oluşturan RRMS ve kontrol gruplarının demografik bilgileri Çizelge 3.1’de verilmiştir. Grup-1’deki RRMS ve kontrol grupları arasında yaş ($P=.13$) ve cinsiyet ($P=.07$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Çizelge 3.1: Grup-1 popülasyonundaki RRMS ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet karşılaştırmaları.

	RRMS (n=400)	Kontrol (n=400)	P
Yaş (yıl), ortalama ± SS	34.4 ± 9.8	33.7 ± 10.9	
medyan (Q1-Q3)	34.0 (26.0-41.0)	31.0 (25.0-41.0)	.13
aralık (min.- maks.)	45.0 (18.0-63.0)	47.0 (18.0-65.0)	
Kadın, n (%)	265 (66.2)	240 (60.0)	
Erkek, n (%)	135 (33.8)	160 (40.0)	.07

Frekans ve yüzde olarak gösterilen verilerin analizi Pearson χ^2 testi ile; ilk satırda ortalama ± SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) ve üçüncü satırda değer aralığı (min.-maks.) olarak gösterilen yaş verisinin analizi Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. n: sayı, SS: standart sapma, min: minimum, maks: maksimum

3.1.2 Grup-2'nin demografik bilgileri

Grup-1 içerisinde bulunan ve rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrol Grup-2'ye dâhil edilmiş, bu bireylerin plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Grup-2 çalışma grubunu oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının demografik bilgileri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet karşılaştırmaları.

	Naif RRMS (n=30)	Fingolimod Alan RRMS (n=29)	Kontrol (n=30)	P
Yaş (yıl), ortalama ± SS	30.8 ± 9.1	35.1 ± 8.4 ^a	26.8 ± 5.8	
medyan (Q1-Q3)	31.0 (24.0-37.0)	35.0 (29.0-41.0)	24.5 (23.0-32.0)	.001
aralık (min.- maks.)	32.0 (18.0-50.0)	31.0 (20.0-51.0)	23.0 (20.0-43.0)	
Kadın, n (%)	19 (63.3)	21 (72.4)	20 (66.7)	
Erkek, n (%)	11 (36.7)	8 (27.6)	10 (33.3)	.75

Frekans ve yüzde olarak gösterilen verilerin analizi Pearson χ^2 testi ile; ilk satırda ortalama ± SS, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) ve üçüncü satırda değer aralığı (min.-maks.) olarak gösterilen yaş verisinin analizi Kruskal-Wallis H testi ile yapılmıştır. Post-hoc analizi Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir ^a: Kontrol grubuyla kıyaslandığında $P < .001$. n: sayı, SS: standart sapma, min: minimum, maks: maksimum

Grup-2'yi oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında yaş bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (Tüm gruplar arası: $P = .001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P < .001$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun yaş ortalaması, kontrol grubunun yaş ortalamasından daha yüksektir. Gruplar arasında cinsiyet ($P = .75$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

3.2 Grup-1’de Gerçekleştirilen İstatistiksel Analizler

Grup-1’i oluşturan 400 RRMS hastası ve 400 kontrolün genotipleme çalışmaları gerçekleştirildikten sonra her bir SNP’nin hasta ve kontrol gruplarındaki gözlenen genotip frekanslarının Hardy-Weinberg dengesine uyumu test edilmiştir. Ardından farklı genotip modellerine göre gruplar arasında genotip ve alel frekansı analizleri gerçekleştirilmiş, gerçekleştirilen çoklu testler için *P* değeri anlamlılık sınırı .05/n olarak yeniden ayarlanmıştır. Daha sonra SNP’lerin genotipleri arasında RRMS hastalarının klinik bilgilerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak RRMS hastalarının EDSS skorları ve MSSS değerleri ile serum 25-(OH) D₃ (25-Hidroksivitamin D₃ – 25-(OH) D₃) ve lipit paneli düzeyleri arasındaki korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Ardından SNP genotiplerinin ve genotip modellerinin MS riskiyle ilişkileri RRMS ve kontrol grupları arasında; klinik parametrelerle bir aradayken orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ve hızlı MS progresyon riski ile ilişkileri de RRMS grubunda ikili lojistik regresyon analizleri ile incelenmiştir. EDSS skoru 3’e eşit veya 3’ten küçük olan hastalar hafif düzey EDSS skoruna, 3’ten büyük hastalar orta düzey EDSS riskine sahip olanlar olarak; MSSS değeri 5’e eşit veya 5’ten küçük olan hastalar yavaş MS progresyonuna, 5’ten büyük olan hastalar hızlı MS progresyon riskine sahip olanlar olarak ikiye ayrılmıştır. Elde edilen sonuçlar ilerleyen bölümlerde detaylarıyla verilmiştir.

3.2.1 Grup-1’deki RRMS hastalarının klinik bilgileri

Grup-1’deki RRMS hastalarının klinik bilgileri cinsiyetler için ayrı ayrı sunulmuş ve bu parametreler RRMS grubunda cinsiyetler arasında karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, RRMS hastalarının hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri, tedavi süreleri, alınan tedavi türleri, serum 25-(OH) D₃, total kolesterol, trigliserit, LDL-kolesterol (low density lipoprotein – LDL), HDL-kolesterol (high density lipoprotein – HDL), VLDL-kolesterol (very low density lipoprotein – VLDL) düzeyleri ve sigara içme durumları cinsiyetler arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.3). Hastalar teşhis almalarının ardından tedaviyle birlikte 25-(OH) D₃ takviyesine başlamıştır. Kategorik olmayan değişkenlerin karşılaştırılması için Mann-Whitney *U* testi kullanılırken, kategorik değişkenlerin karşılaştırılması için Pearson χ^2 testi kullanılmıştır.

Çizelge 3.3: Grup-1 popülasyonundaki RRMS hastalarının klinik bilgilerinin cinsiyetler arasında karşılaştırmaları.

	Kadın (n=265)	Erkek (n=135)	Toplam (n=400)	P
Hastalık Süresi (yıl), ortalama ± SS	5.0 ± 5.0	5.0 ± 6.0	5.0 ± 5.0	
medyan (Q1-Q3)	3.0 (1.0-8.0)	3.0 (1.0-8.0)	3.0 (1.0-8.0)	.86
EDSS, ortalama ± SS	1.4 ± 1.1	1.7 ± 1.3	1.5 ± 1.1	
medyan (Q1-Q3)	1.0 (1.0-2.0)	1.5 (1.0-2.5)	1.0 (1.0-2.0)	.01
EDSS ≤ 3.0, n (%)	251 (94.7)	118 (87.4)	369 (92.3)	
EDSS > 3.0, n (%)	14 (5.3)	17 (12.6)	31 (7.8)	.01
MSSS, ortalama ± SS	2.5 ± 1.8	3.0 ± 2.0	2.7 ± 1.9	
medyan (Q1-Q3)	2.3 (1.0-2.9)	2.4 (1.7-4.6)	2.4 (1.1-3.7)	.009
MSSS ≤ 5.00, n (%)	235 (88.7)	111 (82.2)	346 (86.5)	
MSSS > 5.00, n (%)	30 (11.3)	24 (17.8)	54 (13.5)	.07
Tedavi Süresi (yıl), ortalama ± SS	4.0 ± 4.0	4.0 ± 5.0	4.0 ± 4.0	
medyan (Q1-Q3)	2.0 (1.0-5.0)	2.0 (1.0-6.0)	2.0 (1.0-1.0)	.89
Tedavi (n), N/IF/GA/DMF/TF/F/K/MAB	24/45/40/40/58/45/2/11	23/26/11/17/28/24/2/4	47/71/51/57/86/69/4/15	.31
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	32.3 ± 23.4	34.7 ± 27.9	33.1 ± 25.0	
medyan (Q1-Q3)	24.0 (16.0-44.0)	25.0 (17.0-47.0)	24.5 (16.0-44.5)	.72
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	4.6 ± 1.0	4.7 ± 1.1	4.7 ± 1.0	
medyan (Q1-Q3)	4.6 (3.9-5.1)	4.6 (3.9-5.4)	4.8 (3.9-5.2)	.57
Trigliserit (mmol/L), ortalama ± SS	1.6 ± 1.7	1.9 ± 1.4	1.7 ± 1.6	
medyan (Q1-Q3)	1.2 (0.9-1.8)	1.5 (1.0-2.3)	1.3 (0.9-1.9)	<.001
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	2.6 ± 0.8	2.9 ± 1.0	2.7 ± 0.9	
medyan (Q1-Q3)	2.5 (2.1-3.1)	2.7 (2.7-2.2)	2.6 (2.1-3.1)	.01
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	1.4 ± 0.4	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.4	
medyan (Q1-Q3)	1.4 (1.2-1.7)	1.1 (1.0-1.2)	1.2 (1.1-1.5)	<.001
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.5	0.7 ± 0.5	
medyan (Q1-Q3)	0.5 (0.4-0.7)	0.7 (0.5-1.1)	0.6 (0.4-0.8)	<.001
Sigara (Evet), n (%)	35 (13.2)	69 (51.1)	104 (26.0)	<.001

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. Frekans ve yüzde olarak gösterilen veriler Pearson χ^2 testi ile analiz edilmiştir.
P: Kadınlar-Erkekler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃, N: Naif, IF: İnterferon- β , GA: Glatiramer asetat, DMF: Dimetil fumarat, TF: Teriflunomid, F: Fingolimod, K: Kladribin, MAB: Monoklonal antikor bazlı ilaçlar.

Grup-1’de bulunan kadın ve erkek RRMS hastaları arasında hastalık süresi ($P=.86$), hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ($P=.07$), tedavi süresi ($P=.89$), alınan tedavi türü ($P=.31$), serum 25-(OH) D₃ ($P=.72$) ve total kolesterol ($P=.57$) düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. EDSS skorları ($P=.01$) ve MSSS değerleri ($P=.009$) karşılaştırıldığında EDSS skorlarının ve MSSS değerlerinin erkeklerde kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür. Cinsiyetler arasında orta düzey EDSS riski (EDSS>3) karşılaştırıldığında erkek RRMS hastalarındaki EDSS>3 oranının kadın RRMS hastalarındakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.01$). Serum trigliserit ($P<.001$), LDL-kolesterol ($P=.01$) ve VLDL-kolesterol ($P<.001$) düzeylerinin de erkek RRMS hastalarında kadınlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Cinsiyetler arasında HDL-kolesterol düzeyleri de karşılaştırılmış, HDL-kolesterolün kadınlarda erkeklere göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P<.001$). Cinsiyetler arasında sigara kullanma durumu karşılaştırıldığında ise erkeklerde sigara kullanımının kadınlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yaygın olduğu görülmüştür ($P<.001$).

3.2.2 miRNA SNP’lerinin genotip ve alel frekansları

3.2.2.1 MIR146A rs2910164 G/C SNP’sinin genotip ve alel frekansları

Grup-1’i oluşturan 400 RRMS hastası ve 400 kontrolün MIR146A rs2910164 G/C SNP’sinin genotipleme çalışmalarından sonra belirlenen genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesine uyumu incelenmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: Grup-1 popülasyonunu oluşturan RRMS ve kontrol gruplarında MIR146A rs2910164 G/C SNP’sinin Hardy-Weinberg uyum analizi.

Gruplar	Genotipler	Gözlenen Genotip Frekansları	Beklenen Genotip Frekansları	P
RRMS	GG	216	214.62	.98
	GC	154	156.76	
	CC	30	28.62	
	Toplam	400		
Kontrol	GG	240	234.86	.63
	GC	133	143.29	
	CC	27	21.86	
	Toplam	400		

P değerleri Pearson χ^2 testi ile belirlenmiştir.

RRMS ve kontrol gruplarında gözlemlenen ve beklenen genotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (RRMS: $P=.98$, Kontrol: $P=.63$). Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olan bu SNP'nin genotip ve alel frekansları RRMS ve kontrol grupları arasında farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış ve gruplar arasında OR, CI ve P değerleri Pearson χ^2 testi ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.5). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (resesif ve dominant) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/2=.025$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Buna göre resesif modelde CC genotipinin frekansı GC veya GG genotiplerinin frekansı ile karşılaştırıldığında ve dominant modelde ise CC veya GC genotiplerinin frekansı GG genotipinin frekansı ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Resesif model: $P=.68$, Dominant model: $P=.09$). Hasta ve kontrol grupları arasında polimorfik C aleli frekansı karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.12$).

Çizelge 3.5: Grup-1'de *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve alel frekanslarının dağılımı ve RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması.

<i>MIR146A</i> rs2910164 G/C	RRMS (n=400)	Kontrol (n=400)	OR (%95 CI)	P
Genotip, n (%)			1.12 ^a	
GG	216 (54.0)	240 (60.0)	(0.65-1.92)	.68 ^a
GC	154 (38.5)	133 (33.2)	1.28 ^b	
CC	30 (7.5)	27 (6.8)	(0.97-1.69)	.09 ^b
Alel Frekansı				
G	0.733	0.766	1.20 ^c	
C	0.267	0.234	(0.95-1.50)	.12 ^c

Gruplar arasında genotip ve alel frekansı karşılaştırması için Pearson χ^2 testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.025$ olarak belirlenmiştir.
^aResesif model: CC vs. GC & GG, ^bDominant model: CC & GC vs. GG, ^cC vs. G.

MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin genotip frekansları RRMS ve kontrol grupları arasında SNPStat programı kullanılarak, farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış ve yaşa ve cinsiyete göre düzenlemiş OR, CI ve P değerleri lojistik regresyon analizi ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.6). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (kodominant, dominant, resesif, overdominant ve log-additive) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/5=.01$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Buna göre kodominant ve resesif modelde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kodominant model: $P=.23$, Resesif model:

$P=.68$). Ek olarak AIC ve BIC değerleri en düşük olması sebebiyle en uygun model olan dominant modelde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($P=.09$). Bu modellere ek, overdominant ve log-additive modellerde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Overdominant model: $P=.12$, Log-additive model: $P=.13$).

Çizelge 3.6: Grup-1 popülasyonunda *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması. OR, CI ve P değerleri yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiştir.

Genotip Modelleri	Genotip n (%)	RRMS (n=400)	Kontrol (n=400)	OR (%95 CI)	P	AIC	BIC
Kodominant	GG	216 (54.0)	240 (60.0)	1.29 (0.96-1.73) ^a	.23	1112.1	1126.1
	GC	154 (38.5)	133 (33.2)	1.23 (0.71-2.14) ^b			
	CC	30 (7.5)	27 (6.8)				
Dominant	GG	216 (54.0)	240 (60.0)	1.28 (0.97-1.69) ^c	.09	1110.0	1119.5
	GC-CC	184 (46.0)	160 (40.0)				
Resesif	GG-GC	370 (92.5)	373 (93.2)	1.12 (0.65-1.68) ^d	.68	1112.9	1122.2
	CC	30 (7.5)	27 (6.8)				
Overdominant	GG-CC	246 (61.5)	267 (66.8)	1.26 (0.94-1.68) ^e	.12	1110.6	1120.0
	GC	154 (38.5)	133 (33.2)				
Log-additive	---	---	---	1.19 (0.95-1.48) ^f	.13	1110.7	1120.1

Gruplar arasındaki genotip frekansı karşılaştırmaları SNPStat programı kullanılarak lojistik regresyon ile analiz edilerek yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiş P , OR ve CI değerleri elde edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.01$ olarak belirlenmiştir. ^a: GC vs. GG, ^b: CC vs. GG, ^c: GC & CC vs. GG, ^d: CC vs. GC & GG, ^e: GC vs. GG & CC, ^f: CC vs. GC vs. GG.

3.2.2.2 *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve alel frekansları

Grup-1'i oluşturan 400 RRMS hastası ve 400 kontrolün *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotipleme çalışmalarından sonra belirlenen genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesine uyumu incelenmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7: Grup-1 popülasyonunu oluşturan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin Hardy-Weinberg uyum analizi.

Gruplar	Genotipler	Gözlenen Genotip Frekansları	Beklenen Genotip Frekansları	P
RRMS	TT	296	297.56	.85
	TA	98	94.88	
	AA	6	7.56	
	Toplam	400		
Kontrol	TT	314	307.13	.14
	TA	73	86.75	
	AA	13	6.13	
	Toplam	400		

P değerleri Pearson χ^2 testi ile belirlenmiştir.

RRMS ve kontrol gruplarında gözlemlenen ve beklenen genotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (RRMS: $P=.85$, Kontrol: $P=.14$). Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olan bu SNP'nin genotip ve alel frekansları RRMS ve kontrol grupları arasında farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış ve gruplar arasında OR, CI ve P değerleri Pearson χ^2 testi ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.8). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (resesif ve dominant) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/2=.025$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Buna göre resesif modelde AA genotipinin frekansı TA veya TT genotiplerinin frekansı ile karşılaştırıldığında ve dominant modelde ise AA veya TA genotiplerinin frekansı TT genotipinin frekansı ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Resesif model: $P=.11$, Dominant model: $P=.14$). Hasta ve kontrol grupları arasında polimorfik A aleli frekansı karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.42$).

Çizelge 3.8: Grup-1'de *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve alel frekanslarının dağılımı ve RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması.

<i>MIR155</i> rs767649 T/A	RRMS (n=400)	Kontrol (n=400)	OR (%95 CI)	P
Genotip, n (%)			0.45 ^a	
TT	296 (74.0)	314 (78.5)	(0.17-1.21)	.11 ^a
TA	98 (24.5)	73 (18.3)	1.28 ^b	
AA	6 (1.5)	13 (3.2)	(0.93-1.78)	.14 ^b
Alel Frekansı				
T	0.864	0.876	1.13 ^c	
A	0.136	0.124	(0.85-1.55)	.42 ^c

Gruplar arasında genotip ve alel frekansı karşılaştırması için Pearson χ^2 testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.025$ olarak belirlenmiştir.
^aResesif model: AA vs. TA & TT, ^bDominant model: AA & TA vs. TT, ^cA vs. T.

MIR155 rs767649 T/A SNP'sinin genotip frekansları RRMS ve kontrol grupları arasında SNPStat programı kullanılarak, farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış ve yaşa ve cinsiyete göre düzenlemiş OR, CI ve P değerleri lojistik regresyon analizi ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.9). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (kodominant, dominant, resesif, overdominant ve log-additive) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/5=.01$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Buna göre resesif ve dominant modelde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Resesif model: $P=.10$, Dominant model:

$P=.13$). Ek olarak AIC ve BIC değerleri en düşük olması sebebiyle en uygun model olan overdominant modelde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($P=.03$). Bu modellerin yanı sıra kodominant ve log-additive modellerde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Kodominant model: $P=.03$, Log-additive model: $P=.43$).

Çizelge 3.9: Grup-1 popülasyonunda *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması. OR, CI ve P değerleri yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiştir.

Genotip Modelleri	Genotip n (%)	RRMS (n=400)	Kontrol (n=400)	OR (%95 CI)	P	AIC	BIC
Kodominant	TT	296 (74.0)	314 (78.5)	1.42 (1.01-2.01) ^a	.03	1108.2	1122.2
	TA	98 (24.5)	73 (18.3)	0.49 (0.18-1.30) ^b			
	AA	6 (1.5)	13 (3.2)				
Dominant	TT	296 (74.0)	314 (78.5)	1.28 (0.93-1.78) ^c	.13	1110.8	1120.2
	TA-AA	104 (26.0)	86 (21.5)				
Resesif	TT-TA	394 (98.5)	387 (96.8)	0.45 (0.17-1.20) ^d	.10	1110.3	1119.7
	AA	6 (1.5)	13 (3.2)				
Overdominant	TT-AA	302 (75.5)	327 (81.8)	1.45 (1.03-2.04) ^e	.03	1108.4	1117.7
	TA	98 (24.5)	73 (18.2)				
Log-additive	---	---	---	1.12 (0.84-1.49) ^f	.43	1112.4	1121.8

Gruplar arasındaki genotip frekansı karşılaştırmaları SNPStat programı kullanılarak lojistik regresyon ile analiz edilerek yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiş P , OR ve CI değerleri elde edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.01$ olarak belirlenmiştir. ^a: TA vs. TT, ^b: AA vs. TT, ^c: TA & AA vs. TT, ^d: AA vs. TA & TT, ^e: TA vs. TT & AA, ^f: AA vs. TA vs. TT.

3.2.2.3 *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekansları

Grup-1'i oluşturan 400 RRMS hastası ve 400 kontrolün *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotipleme çalışmalarından sonra belirlenen genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesine uyumu incelenmiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10: Grup-1 popülasyonunu oluşturan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin Hardy-Weinberg uyum analizi.

Gruplar	Genotipler	Gözlenen Genotip Frekansları	Beklenen Genotip Frekansları	P
RRMS	CC	129	132.83	.84
	CT	203	195.35	
	TT	68	71.83	
	Toplam	400		
Kontrol	CC	167	160.66	.64
	CT	173	185.69	
	TT	60	53.66	
	Toplam	400		

P değerleri Pearson χ^2 testi ile belirlenmiştir.

Uyum analizi sonuçlarına göre RRMS ve kontrol gruplarında gözlemlenen ve beklenen genotip frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (RRMS: $P=.84$, Kontrol: $P=.64$). Hardy-Weinberg dengesine uyumlu olan bu SNP'nin genotip ve alel frekansları RRMS ve kontrol grupları arasında farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış ve gruplar arasında OR, CI ve P değerleri Pearson χ^2 testi ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.11). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (resesif ve dominant) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/2=.025$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Buna göre resesif modelde TT genotipinin frekansı CT veya CC genotiplerinin frekansı ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($P=.44$). Dominant modelde TT veya CT genotiplerinin frekansı CC genotipinin frekansı ile karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır; TT veya CT genotipine sahip birey sayısı RRMS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir ($P=.005$). Hasta ve kontrol grupları arasında alel frekansı karşılaştırmasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır; polimorfik T alel frekansı RRMS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir ($P=.018$).

Çizelge 3.11: Grup-1'de *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve alel frekanslarının dağılımı ve RRMS ile kontrol grubu karşılaştırılması.

<i>MIR196A2</i> rs11614913 C/T	RRMS (n=400)	Kontrol (n=400)	OR (%95 CI)	<i>P</i>
Genotip, n (%)			1.16 ^a	
CC	129 (32.2)	167 (41.8)	(0.80-1.70)	.44 ^a
CT	203 (50.8)	173 (43.2)	1.51 ^b	
TT	68 (17.0)	60 (15.0)	(1.13-2.01)	.005 ^b
Alel Frekansı				
C	0.576	0.634	1.27 ^c	
T	0.424	0.366	(1.04-1.56)	.018 ^c

Gruplar arasında genotip ve alel frekansı karşılaştırması için Pearson χ^2 testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.025$ olarak belirlenmiştir.
^aResesif model: TT vs. CT & CC, ^bDominant model: TT & CT vs. CC, ^cT vs. C.

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'sinin genotip frekansları RRMS ve kontrol grupları arasında SNPStat programı kullanılarak, farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış ve yaşa ve cinsiyete göre düzenlemiş OR, CI ve P değerleri lojistik regresyon analizi ile hesaplanmıştır (Çizelge 3.12). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (kodominant, dominant, resesif, overdominant ve log-additive)

kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/5=.01$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Buna göre kodominant ve resesif modelde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (Kodominant model: $P=.02$, Resesif model: $P=.44$). AIC ve BIC değerleri en düşük olması sebebiyle en uygun model olan dominant modelde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır; TT veya CT genotipine sahip birey sayısı RRMS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksektir ($P=.005$). Bu modellerin yanı sıra overdominant ve log-additive modellerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Overdominant model: $P=.03$, Log-additive model: $P=.02$).

Çizelge 3.12: Grup-1 popülasyonunda *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip frekanslarının farklı modellerde RRMS ile kontrol grubu arasında karşılaştırılması. OR, CI ve P değerleri yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiştir.

Genotip Modelleri	Genotip n (%)	RRMS (n=400)	Kontrol (n=400)	OR (%95 CI)	P	AIC	BIC
Kodominant	CC	129 (32.2)	167 (41.8)	1.52 (1.12-2.06) ^a	.02	1107.2	1121.3
	CT	203 (50.8)	173 (43.2)	1.47 (0.97-2.22) ^b			
	TT	68 (17.0)	60 (15.0)				
Dominant	CC	129 (32.2)	167 (41.8)	1.51 (1.13-2.01) ^c	.005	1105.3	1114.6
	CT-TT	271 (67.8)	233 (58.2)				
Resesif	CC-CT	332 (83.0)	340 (85.0)	1.16 (0.79-1.69) ^d	.44	1108.5	1117.9
	TT	68 (17.0)	60 (15.0)				
Overdominant	CC-TT	197 (49.2)	227 (56.8)	1.35 (1.02-1.79) ^e	.03	1108.5	1117.9
	CT	203 (50.8)	173 (43.2)				
Log-additive	---	---	---	1.27 (1.04-1.55) ^f	.02	1107.6	1116.9

Gruplar arasındaki genotip frekansı karşılaştırmaları SNPStat programı kullanılarak lojistik regresyon ile analiz edilerek yaşa ve cinsiyete göre düzenlenmiş P , OR ve CI değerleri elde edilmiştir. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.01$ olarak belirlenmiştir. ^a: CT vs. CC, ^b: TT vs. CC, ^c: CT & TT vs. CC, ^d: TT vs. CT & CC, ^e: CT vs. CC & TT, ^f: TT vs. CT vs. CC.

3.2.2.4 SNP genotiplerinin kombinasyonları ile gerçekleştirilen analizler

Bu tezde çalışılan miRNA SNP genotiplerinin ikili ve üçlü kombinasyonlarının RRMS ve kontrol gruplarında dağılımı incelenmiş OR, CI ve P değerleri Pearson χ^2 testi ile hesaplanmıştır. Kombine genotipe sahip birey sayısının gruplarda beş veya beşten az olması durumunda Fisher's Exact Test uygulanmıştır. SNP'lerin kombinasyonları ile yapılan analizlerde çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı SNP sayısına bölünmüş ve $.05/3=.0167$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Bu tez çalışmasında genotipleme çalışması gerçekleştirilen üç SNP bulunduğu için SNP genotiplerinin ikili ve üçlü kombinasyonları oluşturulmuş, SNP genotiplerinin bir aradayken hastalık riskiyle olan ilişkisi incelenmiştir (Çizelge 3.13).

Kombine genotiplerden GGTT ($P=.007$) ve GGCC ($P=.008$) ikili kombinasyonlarına sahip bireyler kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazlayken, TACT ($P<.001$) ikili kombinasyonuna ve GGTACT ($P=.003$) üçlü kombinasyonuna sahip bireyler RRMS hasta grubunda anlamlı derecede daha fazladır.

Çizelge 3.13: Grup-1 popülasyonunda kombine SNP genotiplerinin RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırmaları.

SNP'ler	Kombine	RRMS	Kontrol	RRMS vs. Kontrol	
SNP Kombinasyonları	Genotipler	n=400	n=400	OR (%95 CI)	P
rs2910164 & rs767649	GGTT	162	200	0.68 (0.52-0.90)	.007
	GGTA	52	33	1.66 (1.05-2.63)	.03
	GGAA	2	7	0.28 (0.06-1.37)	.18*
	GCTT	111	97	1.20 (0.87-1.65)	.26
	GCTA	40	33	1.24 (0.76-2.00)	.39
	GCAA	3	3	1.00 (0.20-4.99)	>.99
	CCTT	23	17	1.37 (0.72-2.61)	.33
	CCTA	6	7	0.86 (0.29-2.57)	.77
rs2910164 & rs11614913	GGCC	67	97	0.63 (0.44-0.89)	.008
	GGCT	106	107	0.99 (0.72-1.35)	>.99
	GGTT	43	36	1.22 (0.76-1.94)	.41
	GCCC	51	60	0.83 (0.55-1.24)	.36
	GCCT	82	57	1.55 (1.07-2.25)	.02
	GCTT	21	16	1.33 (0.68-2.59)	.40
	CCCC	11	10	1.10 (0.46-2.63)	.83
	CCCT	15	9	1.69 (0.73-3.91)	.21
rs767649 & rs11614913	CCTT	4	8	0.50 (0.15-1.66)	.38*
	TTCC	108	136	0.72 (0.53-0.97)	.03
	TTCT	143	140	1.03 (0.77-1.38)	.82
	TTTT	45	38	1.21 (0.77-1.91)	.42
	TACC	21	28	0.74 (0.41-1.32)	.30
	TACT	56	26	2.34 (1.44-3.81)	<.001
	TATT	21	19	1.11 (0.59-2.10)	.75
	AACT	4	7	0.57 (0.17-1.95)	.55*
rs2910164, rs767649 & rs11614913	GGTTCC	57	83	0.64 (0.44-0.92)	.02
	GGTTCT	77	92	0.80 (0.57-1.12)	.19
	GGTTTT	28	25	1.13 (0.65-1.97)	.67
	GGTACC	10	13	0.76 (0.33-1.76)	.53
	GGTACT	28	10	2.94 (1.41-6.13)	.003
	GGTATT	14	10	1.42 (0.62-3.22)	.41
	GGAAC	1	5	0.20 (0.02-1.70)	.10*
	GCTTCC	44	47	0.93 (0.60-1.44)	.74
	GCTTCT	53	41	1.34 (0.87-2.06)	.19
	GCTTTT	14	9	1.58 (0.67-3.68)	.29
	GCTACC	7	12	0.58 (0.22-1.49)	.25
	GCTACT	27	15	1.86 (0.97-3.55)	.06
	GCTATT	6	6	1.00 (0.57-1.77)	>.99
	CCTTCC	4	6	0.66 (0.19-2.37)	.75*
	CCTTCT	1	7	0.14 (0.02-1.15)	.07*
	CCTACC	4	3	1.34 (0.30-6.01)	>.99*

Karşılaştırmalar bu genotip kombinasyonuna sahip olanlar ve olmayanlar olmak üzere ayrılarak RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında genotip frekansı karşılaştırmaları için Pearson χ^2 testi kullanılmıştır. *:Fisher's Exact Test kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.0167$ olarak belirlenmiştir.

3.2.3 miRNA SNP genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri

3.2.3.1 *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri

MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.14). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/3=.0167$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Kategorik olmayan değişkenler kodominant modelde genotipler arasında (GG vs. GC vs. CC) Kruskal-Wallis *H* testi ile, resesif (CC vs. GG+GC) ve dominant modelde (GC+CC vs. GG) ise Mann-Whitney *U* testi ile karşılaştırılmıştır. Kategorik değişkenlerin analizi ise kodominant, resesif ve dominant modellerde Pearson χ^2 testi ile gerçekleştirilmiştir.

400 RRMS hastası genotiplere göre gruplandırılıp hastalık ve tedavi süresi farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında hastalık süresi (Kodominant model: $P=.39$, Resesif model: $P=.40$, Dominant model: $P=.20$) ve tedavi süresi (Kodominant model: $P=.80$, Resesif model: $P=.55$, Dominant model: $P=.92$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. EDSS skorları ve MSSS değerleri de genotipler arasında farklı genotip modelleri kullanılarak karşılaştırılmış, EDSS skorları (Kodominant model: $P=.62$, Resesif model: $P=.90$, Dominant model: $P=.38$) ve MSSS değerleri (Kodominant model: $P=.89$, Resesif model: $P=.66$, Dominant model: $P=.75$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Genotipler arasında orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında kodominant ($P=.73$), resesif ($P=.82$) ve dominant ($P=.51$) modelde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) de farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış, kodominant ($P=.10$), resesif ($P=.28$) ve dominant ($P=.04$) modelde genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. RRMS'li hastaların kullandıkları tedavi türleri de farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında kodominant ($P=.26$), resesif ($P=.10$) ve dominant ($P=.81$) modelde genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Çizelge 3.14: *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotiplerine göre Grup-1'deki RRMS'li hastaların klinik bilgileri.

	GG (n=216)	GC (n=154)	CC (n=30)	P ^a	P ^b	P ^c
Cinsiyet (Kadın), n (%)	146 (67.6)	99 (64.3)	20 (66.7)	.80	.96	.54
Hastalık Süresi (yıl), ortalama ± SS	5.0 ± 5.0	6.0 ± 5.0	6.0 ± 6.0			
medyan (Q1-Q3)	3.0 (1.0-7.0)	3.0 (1.0-8.0)	4.0 (1.0-11.0)	.39	.40	.20
EDSS, ortalama ± SS	1.4 ± 1.1	1.5 ± 1.1	1.5 ± 1.3			
medyan (Q1-Q3)	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	.62	.90	.38
EDSS ≤ 3.0, n (%)	201 (93.1)	140 (90.9)	28 (93.3)			
EDSS > 3.0, n (%)	15 (6.9)	14 (9.1)	2 (6.7)	.73	.82	.51
MSSS, ortalama ± SS	2.6 ± 1.8	2.7 ± 2.0	2.6 ± 2.1			
medyan (Q1-Q3)	2.4 (1.2-3.7)	2.4 (1.1-3.7)	2.2 (0.9-3.3)	.89	.66	.75
MSSS ≤ 5.00, n (%)	194 (89.8)	128 (83.1)	24 (80.0)			
MSSS > 5.00, n (%)	22 (10.2)	26 (16.9)	6 (20.0)	.10	.28	.04
Tedavi Süresi (yıl), ortalama ± SS	4.0 ± 4.0	4.0 ± 4.0	4.0 ± 4.0			
medyan (Q1-Q3)	2.0 (1.0-5.0)	2.0 (1.0-5.0)	3.0 (1.0-5.0)	.80	.55	.92
Tedavi (n), N/IF/GA/DMF/TF/F/K/MAB	22/37/25/33/50/38/3/8	23/22/23/18/34/27/1/6	2/12/3/6/2/4/0/1	.26	.10	.81
25-(OH) D₃ (nmol/L), ortalama ± SS	32.7 ± 24.2	33.3 ± 26.1	35.3 ± 25.5			
medyan (Q1-Q3)	24.0 (16.0-44.0)	24.0 (16.0-46.0)	27.0 (18.0-42.0)	.72	.43	.67
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	4.7 ± 1.0	4.7 ± 1.0	4.6 ± 1.1			
medyan (Q1-Q3)	4.6 (3.9-5.3)	4.6 (4.0-5.1)	4.5 (3.8-5.0)	.81	.53	.99
Trigliserit (mmol/L), ortalama ± SS	1.6 ± 1.2	1.8 ± 2.1	1.7 ± 1.1			
medyan (Q1-Q3)	1.2 (0.9-1.9)	1.4 (0.9-2.3)	1.2 (0.9-1.9)	.50	.75	.24
LDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.8	2.7 ± 1.0			
medyan (Q1-Q3)	2.6 (2.1-3.1)	2.7 (2.2-3.1)	2.4 (2.1-3.3)	.67	.56	.65
HDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3			
medyan (Q1-Q3)	1.3 (1.1-1.6)	1.2 (1.1-1.5)	1.2 (1.1-1.4)	.69	.91	.40
VLDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.4			
medyan (Q1-Q3)	0.5 (0.4-0.8)	0.6 (0.4-0.9)	0.6 (0.4-0.8)	.61	.82	.39
Sigara (Evet), n (%)	49 (22.7)	45 (29.2)	10 (33.3)	.11	.14	.06

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler kodominant model için Kruskal-Wallis *H* testi ile; resesif ve dominant modeller için Mann-Whitney *U* testi ile analiz edilmiştir. Frekans ve yüzde olarak gösterilen veriler Pearson χ^2 testi ile analiz edilmiştir. P^a: Kodominant model, ^a: GG vs. GC vs. CC. P^b: Resesif model, ^b: CC vs. GG+GC. P^c: Dominant model, ^c: GC+CC vs. GG. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.0167$ olarak belirlenmiştir. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃, N: Naif, IF: İnterferon- β , GA: Glatiramer asetat, DMF: Dimetil fumarat, TF: Teriflunomid, F: Fingolimod, K: Kladribin, MAB: Monoklonal antikor bazlı ilaçlar.

RRMS'li hastaların serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri de farklı genotip modelleri kurularak genotipler arasında karşılaştırılmıştır. Buna göre, genotipler arasında serum 25-(OH) D₃ değerleri farklı genotip modellerine göre karşılaştırıldığında kodominant modelde ($P=.72$), resesif modelde ($P=.43$) ve dominant modelde ($P=.67$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde lipit parametreleri de farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış, total kolesterol (Kodominant model: $P=.81$, Resesif model: $P=.53$, Dominant model: $P=.99$), trigliserit (Kodominant model: $P=.50$, Resesif model: $P=.75$, Dominant model: $P=.24$), LDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.67$, Resesif model: $P=.56$, Dominant model: $P=.65$), HDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.69$, Resesif model: $P=.91$, Dominant model: $P=.40$) ve VLDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.61$, Resesif model: $P=.82$, Dominant model: $P=.39$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Genotipler arasında kurulan genotip modellerine göre cinsiyet bakımından da kodominant modelde ($P=.80$), resesif modelde ($P=.96$) ve dominant modelde ($P=.54$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Son olarak genotipler arasında RRMS'li hastaların sigara kullanma durumu da farklı genotip modellerine göre karşılaştırılmış, kodominant modelde ($P=.11$), resesif modelde ($P=.14$) ve dominant modelde ($P=.06$) genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

3.2.3.2 *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri

MIR155 rs767649 T/A SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.15). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/3=.0167$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Kategorik olmayan değişkenler kodominant modelde genotipler arasında (TT vs. TA vs. AA) Kruskal-Wallis H testi ile, resesif (AA vs. TT+TA) ve dominant modelde (TA+AA vs. TT) ise Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Kategorik değişkenlerin analizi ise kodominant, resesif ve dominant modellerde Pearson χ^2 testi ile gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.15: *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotiplerine göre Grup-1'deki RRMS'li hastaların klinik bilgileri.

	TT (n=296)	TA (n=98)	AA (n=6)	P ^a	P ^b	P ^c
Cinsiyet (Kadın), n (%)	203 (68.6)	59 (60.2)	3 (50.0)	.22	.40	.10
Hastalık Süresi (yıl), ortalama ± SS	5.0 ± 5.0	4.0 ± 5.0	7.0 ± 6.0			
medyan (Q1-Q3)	4.0 (1.0-8.0)	2.0 (1.0-6.0)	7.0 (1.0-13.0)	.06	.44	.04
EDSS, ortalama ± SS	1.5 ± 1.2	1.4 ± 1.1	1.4 ± 1.6			
medyan (Q1-Q3)	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-1.0)	.71	.43	.72
EDSS ≤ 3.0, n (%)	274 (92.6)	90 (91.8)	5 (83.3)			
EDSS > 3.0, n (%)	22 (7.4)	8 (8.2)	1 (16.7)	.69	.41	.69
MSSS, ortalama ± SS	2.6 ± 1.8	2.8 ± 2.0	1.8 ± 1.6			
medyan (Q1-Q3)	2.4 (1.2-3.6)	2.4 (1.1-4.3)	1.2 (0.7-2.4)	.34	.21	.65
MSSS ≤ 5.00, n (%)	258 (87.2)	82 (83.7)	6 (100.0)			
MSSS > 5.00, n (%)	38 (12.8)	16 (16.3)	0 (0.0)	.42	.33	.51
Tedavi Süresi (yıl), ortalama ± SS	4.0 ± 4.0	3.0 ± 4.0	2.0 ± 2.0			
medyan (Q1-Q3)	2.0 (1.0-6.0)	1.0 (0.0-5.0)	1.0 (0.0-3.0)	.03	.22	.011
Tedavi (n), N/IF/GA/DMF/TF/F/K/MAB	28/53/34/44/67/55/3/12	17/18/16/12/17/14/1/3	2/0/1/1/2/0/0/0	.54	.81	.18
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	31.8 ± 22.6	37.0 ± 31.1	37.2 ± 24.3			
medyan (Q1-Q3)	24.0 (16.0-42.0)	26.0 (16.0-53.0)	33.0 (20.0-61.0)	.62	.60	.36
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	4.7 ± 1.0	4.6 ± 1.1	4.9 ± 1.3			
medyan (Q1-Q3)	4.6 (3.9-5.2)	4.5 (3.9-5.1)	4.9 (4.1-5.8)	.68	.48	.72
Trigliserit (mmol/L), ortalama ± SS	1.7 ± 1.7	1.6 ± 1.2	1.7 ± 1.8			
medyan (Q1-Q3)	1.3 (0.9-2.0)	1.2 (0.9-1.9)	1.0 (1.0-1.6)	.57	.48	.36
LDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	2.7 ± 0.8	2.7 ± 0.9	3.1 ± 1.0			
medyan (Q1-Q3)	2.6 (2.1-3.1)	2.5 (2.2-3.2)	3.0 (2.5-3.9)	.59	.30	.77
HDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.3			
medyan (Q1-Q3)	1.2 (1.0-1.5)	1.2 (1.1-1.5)	1.2 (1.1-1.5)	.83	.70	.71
VLDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.5	0.8 ± 0.9			
medyan (Q1-Q3)	0.6 (0.4-0.8)	0.6 (0.4-0.9)	0.4 (0.4-0.8)	.80	.53	.75
Sigara (Evet), n (%)	76 (25.7)	25 (25.5)	3 (50.0)	.36	.17	.54

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler kodominant model için Kruskal-Wallis *H* testi ile; resesif ve dominant modeller için Mann-Whitney *U* testi ile analiz edilmiştir. Frekans ve yüzde olarak gösterilen veriler Pearson χ^2 testi ile analiz edilmiştir. P^a: Kodominant model, ^a: TT vs. TA vs. AA. P^b: Resesif model, ^b: AA vs. TT+TA. P^c: Dominant model, ^c: TA+AA vs. TT. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=.0167$ olarak belirlenmiştir. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃, N: Naif, IF: İnterferon- β , GA: Glatiramer asetat, DMF: Dimetil fumarat, TF: Teriflunomid, F: Fingolimod, K: Kladribin, MAB: Monoklonal antikor bazlı ilaçlar.

400 RRMS'li hasta genotiplere göre gruplandırılıp hastalık ve tedavi süresi farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında hastalık süresi (Kodominant model: $P=.06$, Resesif model: $P=.44$, Dominant model: $P=.04$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Tedavi süresi karşılaştırıldığında da kodominant ($P=.03$) ve resesif ($P=.22$) modelde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamış olsa da dominant modelde ($P=.011$) TT genotipine sahip bireylerin TA veya AA genotipine sahip bireylerden istatistiksel anlamda daha uzun süredir tedavi almakta olduğu görülmüştür. EDSS skorları ve MSSS değerleri de genotipler arasında farklı genotip modelleri kullanılarak karşılaştırılmış, EDSS skorları (Kodominant model: $P=.71$, Resesif model: $P=.43$, Dominant model: $P=.72$) ve MSSS değerleri (Kodominant model: $P=.34$, Resesif model: $P=.21$, Dominant model: $P=.65$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Genotipler arasında orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında kodominant ($P=.69$), resesif ($P=.41$) ve dominant ($P=.69$) modelde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) de farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış, kodominant ($P=.42$), resesif ($P=.33$) ve dominant ($P=.51$) modelde genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. RRMS'li hastaların kullandıkları tedavi türleri de farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında kodominant ($P=.54$), resesif ($P=.81$) ve dominant ($P=.18$) modelde genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. RRMS'li hastaların serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri de farklı genotip modelleri kurularak genotipler arasında karşılaştırılmıştır. Buna göre, genotipler arasında serum 25-(OH) D₃ değerleri farklı genotip modellerine göre karşılaştırıldığında kodominant ($P=.62$), resesif ($P=.60$) ve dominant ($P=.36$) modelde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde lipit parametreleri de farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış, total kolesterol (Kodominant model: $P=.68$, Resesif model: $P=.48$, Dominant model: $P=.72$), trigliserit (Kodominant model: $P=.57$, Resesif model: $P=.48$, Dominant model: $P=.36$), LDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.59$, Resesif model: $P=.30$, Dominant model: $P=.77$), HDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.83$, Resesif model: $P=.70$, Dominant model: $P=.71$) ve VLDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.80$, Resesif model: $P=.53$, Dominant model: $P=.75$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı

görülmüştür. Genotipler arasında cinsiyet bakımından da kurulan genotip modellerine göre kodominant ($P=.22$), resesif ($P=.40$) ve dominant ($P=.10$) modelde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Son olarak genotipler arasında RRMS'li hastaların sigara kullanma durumu da farklı genotip modellerine göre karşılaştırılmış, kodominant ($P=.36$), resesif ($P=.17$) ve dominant ($P=.54$) modelde genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

3.2.3.3 *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'sinin genotiplerine göre RRMS'li hastaların klinik bilgileri farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.16). Bu analizlerde farklı genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/3=.0167$ olarak yeniden hesaplanmıştır. Kategorik olmayan değişkenler kodominant modelde genotipler arasında (CC vs. CT vs. TT) Kruskal-Wallis H testi ile, resesif (TT vs. CC+CT) ve dominant modelde (CT+TT vs. CC) ise Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Kategorik değişkenlerin analizi ise kodominant, resesif ve dominant modellerde Pearson χ^2 testi ile gerçekleştirilmiştir.

400 RRMS'li hasta genotiplere göre gruplandırılıp hastalık ve tedavi süresi farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında hastalık süresi (Kodominant model: $P=.50$, Resesif model: $P=.24$, Dominant model: $P=.61$) ve tedavi süresi (Kodominant model: $P=.52$, Resesif model: $P=.30$, Dominant model: $P=.91$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. EDSS skorları ve MSSS değerleri de genotipler arasında farklı genotip modelleri kullanılarak karşılaştırılmış, EDSS skorları (Kodominant model: $P=.43$, Resesif model: $P=.21$, Dominant model: $P=.97$) ve MSSS değerleri (Kodominant model: $P=.73$, Resesif model: $P=.56$, Dominant model: $P=.75$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Genotipler arasında orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında kodominant modelde ($P=.04$), resesif modelde ($P=.40$) ve dominant modelde ($P=.05$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Çizelge 3.16: *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotiplerine göre Grup-1'deki RRMS'li hastaların klinik bilgileri.

	CC (n=129)	CT (n=203)	TT (n=68)	P ^a	P ^b	P ^c
Cinsiyet (Kadın), n(%)	92 (71.3)	132 (65.0)	41 (60.3)	.26	.25	.14
Hastalık Süresi (yıl), ortalama ± SS	5.0 ± 5.0	5.0 ± 5.0	6.0 ± 5.0	.50	.24	.61
medyan (Q1-Q3)	3.0 (1.0-8.0)	3.0 (1.0-7.0)	4.0 (1.0-9.0)			
EDSS, ortalama ± SS	1.5 ± 1.3	1.4 ± 0.9	1.7 ± 1.3	.43	.21	.97
medyan (Q1-Q3)	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)			
EDSS ≤ 3.0, n (%)	114 (88.4)	194 (95.6)	61 (89.7)	.04	.40	.05
EDSS > 3.0, n (%)	15 (11.6)	9 (4.4)	7 (10.3)			
MSSS, ortalama ± SS	2.7 ± 2.0	2.5 ± 1.8	2.8 ± 1.9	.73	.56	.75
medyan (Q1-Q3)	2.4 (1.3-4.1)	2.4 (1.1-3.5)	2.4 (1.4-3.9)			
MSSS ≤ 5.00, n (%)	110 (85.3)	180 (88.7)	56 (82.4)	.37	.27	.62
MSSS > 5.00, n (%)	19 (14.7)	23 (11.3)	12 (17.6)			
Tedavi Süresi (yıl), ortalama ± SS	4.0 ± 5.0	3.0 ± 4.0	4.0 ± 4.0	.52	.30	.91
medyan (Q1-Q3)	2.0 (1.0-5.0)	2.0 (1.0-5.0)	3.0 (1.0-6.0)			
Tedavi (n), N/IF/GA/DMF/TF/F/K/MAB	14/18/16/18/32/23/1/7	27/41/28/28/40/32/3/4	6/12/7/11/14/14/0/4	.63	.53	.69
25-(OH) D₃ (nmol/L), ortalama ± SS	33.7 ± 26.8	33.0 ± 24.3	32.4 ± 23.8	.93	.70	.94
medyan (Q1-Q3)	25.0 (16.0-42.0)	24.0 (16.0-46.0)	23.5 (15.0-41.5)			
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	4.7 ± 0.9	4.6 ± 1.0	4.8 ± 1.1	.26	.33	.34
medyan (Q1-Q3)	4.7 (4.0-5.3)	4.5 (3.8-5.2)	4.6 (4.1-5.3)			
Trigliserit (mmol/L), ortalama ± SS	1.7 ± 2.1	1.6 ± 1.1	1.9 ± 1.8	.58	.32	.53
medyan (Q1-Q3)	1.3 (0.9-1.8)	1.3 (0.9-2.0)	1.4 (0.9-2.0)			
LDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	2.7 ± 0.7	2.7 ± 0.9	2.8 ± 0.9	.57	.37	.80
medyan (Q1-Q3)	2.7 (2.1-3.1)	2.5 (2.1-3.2)	2.6 (2.3-3.1)			
HDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	1.4 ± 0.4	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3	.34	.68	.23
medyan (Q1-Q3)	1.3 (1.1-1.6)	1.2 (1.0-1.5)	1.3 (1.1-1.6)			
VLDL-Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	0.7 ± 0.5	0.7 ± 0.4	0.7 ± 0.5	.73	.47	.57
medyan (Q1-Q3)	0.6 (0.4-0.8)	0.6 (0.4-0.8)	0.6 (0.4-0.9)			
Sigara (Evet), n (%)	29 (22.5)	60 (29.6)	15 (22.1)	.26	.53	.21

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler eş dominant model için Kruskal-Wallis *H* testi ile; resesif ve dominant modeller için Mann-Whitney *U* testi ile analiz edilmiştir. Frekans ve yüzde olarak gösterilen veriler Pearson χ^2 testi ile analiz edilmiştir. P^a: Eş dominant model, ^a: CC vs. CT vs. TT. P^b: Resesif model, ^b: TT vs. CC+CT. P^c: Dominant model, ^c: CT+TT vs. CC. Çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi uygulanmış olup anlamlılık sınırı $\alpha=0.0167$ olarak belirlenmiştir. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃, N: Naif, IF: İnterferon- β , GA: Glatiramer asetat, DMF: Dimetil fumarat, TF: Teriflunomid, F: Fingolimod, K: Kladribin, MAB: Monoklonal antikor bazlı ilaçlar.

Benzer şekilde hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) de farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış, kodominant modelde ($P=.37$), resesif modelde ($P=.27$) ve dominant modelde ($P=.62$) genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. RRMS'li hastaların kullandıkları tedavi türleri de farklı genotip modellerinde karşılaştırıldığında kodominant modelde ($P=.63$), resesif modelde ($P=.53$) ve dominant modelde ($P=.69$) genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. RRMS'li hastaların serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri de farklı genotip modelleri kurularak genotipler arasında karşılaştırılmıştır. Buna göre, genotipler arasında serum 25-(OH) D₃ düzeyleri farklı genotip modellerine göre karşılaştırıldığında kodominant modelde ($P=.93$), resesif modelde ($P=.70$) ve dominant modelde ($P=.94$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde lipit parametreleri de farklı genotip modelleri kurularak karşılaştırılmış, total kolesterol (Kodominant model: $P=.26$, Resesif model: $P=.33$, Dominant model: $P=.34$), trigliserit (Kodominant model: $P=.58$, Resesif model: $P=.32$, Dominant model: $P=.53$), LDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.57$, Resesif model: $P=.37$, Dominant model: $P=.80$), HDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.34$, Resesif model: $P=.68$, Dominant model: $P=.23$) ve VLDL-kolesterol (Kodominant model: $P=.73$, Resesif model: $P=.47$, Dominant model: $P=.57$) bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Genotipler arasında cinsiyet bakımından da kurulan genotip modellerine göre kodominant modelde ($P=.26$), resesif modelde ($P=.25$) ve dominant modelde ($P=.14$) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Son olarak genotipler arasında RRMS'li hastaların sigara kullanma durumu da farklı genotip modellerine göre karşılaştırılmış, kodominant modelde ($P=.26$), resesif modelde ($P=.53$) ve dominant modelde ($P=.21$) genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

3.2.4 Korelasyon analizleri

Grup-1'i oluşturan 400 RRMS hastasının EDSS skorlarının ve MSSS değerlerinin; serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri ile aralarındaki ilişkinin incelenmesi için korelasyon analizleri gerçekleştirilmiş, anlamlılık değerleri ve korelasyon katsayıları Çizelge 3.17'de sunulmuştur. Parametreler normal dağılım göstermediği için ilişkileri Spearman korelasyon analizi ile incelenmiş ve Spearman korelasyon katsayısı (ρ) hesaplanmıştır.

Çizelge 3.17: Grup-1'deki RRMS hastalarında (n=400) EDSS ve MSSS ile serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri arasındaki ilişkinin incelenmesi.

		EDSS	MSSS
EDSS	Spearman's ρ	1.000	.795
	<i>P</i>	.	<.001
MSSS	Spearman's ρ	.795	1.000
	<i>P</i>	<.001	.
Total Kolesterol	Spearman's ρ	.103	.014
	<i>P</i>	.04	.78
Trigliserit	Spearman's ρ	.228	.146
	<i>P</i>	<.001	.004
LDL Kolesterol	Spearman's ρ	.082	-.009
	<i>P</i>	.104	.86
HDL Kolesterol	Spearman's ρ	-.110	-.100
	<i>P</i>	.03	.046
VLDL Kolesterol	Spearman's ρ	.248	.185
	<i>P</i>	<.001	<.001
25-(OH) D ₃	Spearman's ρ	-.036	-.039
	<i>P</i>	.47	.44

EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, LDL: Low density lipoprotein, HDL: High density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

RRMS hastalarında EDSS skorlarıyla total kolesterol ($\rho=.103$, $P=.04$), trigliserit ($\rho=.228$, $P<.001$) ve VLDL-kolesterol ($\rho=.248$, $P<.001$) düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon; HDL-kolesterol düzeyleri ($\rho=-.110$, $P=.03$) arasında negatif bir korelasyon görülmektedir. MSSS değerleriyle ise trigliserit ($\rho=.146$, $P=.004$) ve VLDL-kolesterol ($\rho=.185$, $P<.001$) düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon; MSSS değerleri ve HDL-kolesterol ($\rho=-.100$, $P=.046$) düzeyleri arasında negatif bir korelasyon görülmektedir. Bu sonuçlar dışında EDSS skorları ve MSSS değerlerinin korelasyon analizi sonucunda anlamlı olan başka parametre bulunmamaktadır.

3.2.5 Lojistik regresyon analizleri

Genotipleme çalışmalarının gerçekleştirildiği örnek grubu olan Grup-1'de bu tez çalışmasında incelenen SNP'lerin genotiplerinin ve farklı genotip modellerinin MS hastalık riskiyle ilişkileri RRMS ve kontrol grupları arasında, bu genotiplerin ve farklı genotip modellerinin klinik parametrelerle bir aradayken orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) ve hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) ile ilişkileri ise RRMS grubunda ikili lojistik regresyon analizleri ile incelenmiştir. Bu analizlerde bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri incelenmiş, detayları alt başlıklarda açıklanmıştır.

Model seçimini otomatik olarak gerçekleştiren algoritmalar özellik seçimi konusunda tam bağımsız bir şekilde çalışmakta ve analiz sonuçlarının kasıtlı kısıtlardan kaynaklanan sapmalardan etkilenmemesini sağlamaktadır. Özellik seçme algoritması olarak bu tez çalışmasında PLS Regresyon kullanılmıştır. PLS Regresyon bağımlı değişkenin alabileceği değerleri tahmin eden en iyi parametreleri bulmak için kullanılan istatistiksel bir özellik seçme algoritmasıdır (Abdi, 2010). Bağımlı değişkendeki varyansı en iyi açıklayan bağımsız değişkenler, lineer latent faktörler üreterek modellenmiş ve bu modellerdeki değişkenler arasında bir önem sıralaması yapılmıştır. Üretilen lineer latent faktörler içerisinde X ve Y düzlemindeki varyansı en iyi şekilde açıklayan latent faktör seçilmiş ve bu latent faktör içerisindeki parametrelerden önem derecesi 1'den büyük olan parametreler modellere dâhil edilmiştir (Abdi, 2010). Lineer latent faktörü oluşturacak olan bağımsız değişkenler kategorize edilebilir ancak bu durumda parametre seçimine müdahale edilmiş olur. Bu durum analizler arasında belirli tutarsızlığa yol açabileceği için lojistik regresyon modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan parametrelerin seçimi için yapılan PLS yönteminde tüm parametreler bir arada tutularak incelenmiştir. Buna rağmen SNP genotipleri ve genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) birbirleri ile bağımlı olduğu için ayrı ayrı incelenmiştir.

Lojistik regresyon analizleri için kurulan modellerde bulunan bazı bağımsız değişkenler birbirleriyle yüksek doğrusal korelasyona sahip olabilir ve bu korelasyondan dolayı bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenin üzerindeki etkisi dağılmaktadır. Modellerin doğru çalışabilmesi için bu tez çalışmasında PLS algoritmasıyla seçilen bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan ilişki skorları (Variance inflation factor – VIF) incelenmiştir. VIF skorları için 1 alt sınırken, parametreler arası ilişki arttıkça VIF skorları da sonsuza doğru artmaktadır. Bu tez çalışmasında modele dâhil edilecek olan parametrelerin VIF skorlarının belirlenmesi için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiş ve VIF skoru 3.0 ve üzeri olan parametreler eş lineer olarak belirlenmiştir (Sarabia & Ortiz, 2009). Eş lineer olarak belirlenen parametreler kurulan lojistik regresyon modellerine birlikte dâhil edilmemiştir. Bu bağımsız değişkenler birbirlerinden ayrı bir şekilde diğer parametrelerle bir arada olacak şekilde modeller kurulmuştur.

3.2.5.1 MS hastalık riski için yapılan analizler

Bu analizlerde kodominant, resesif ve dominant modellerde genotip frekanslarının hastalık riskiyle ilişkisi incelenmiştir. Hastalık durumu bağımlı değişken ve RRMS hastaları riskli olarak kabul edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin seçimi için PLS kullanılmış olup modellerin doğru bir şekilde kurgulanması için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiştir. Resesif modelde rs767649 T/A SNP'si ve dominant modelde rs11314913 C/T SNP'si PLS'e göre tek bağımsız parametre olarak seçildiği için lojistik regresyon analizlerine devam edilmemiş, bu SNP'lerin hastalık riski ile ilişkisi bölüm 3.2.2.2'de ve 3.2.2.3'te incelenmiştir. Kodominant modelde ise rs767649 T/A SNP'sinin TA genotipi ve rs11614913 C/T SNP'sinin CT genotipi bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Genotiplerin eş lineerlik testi sonucunda VIF skorları üçten küçük olduğu için ikisinin bir arada bulunduğu tek bir model kurularak lojistik regresyon analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18: Grup-1 çalışma popülasyonunda RRMS (n=400) ve Kontrol (n=400) grupları arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan model ve hastalık riski ile ilişkili bulunan parametreler.

Model	İlişkili Bulunanlar	OR	%95 CI	P	Doğruluk Oranı (%)	Hosmer & Lemeshow		
						χ^2	df	P
rs767649 TA, rs11614913 CT	rs11614913 CT Genotipi	1.520	1.117-2.070	.008	54.4	5.067	5	.41
Parametrelerin seçimi PLS yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve ilişkili parametrelerin olduğu modeller VIF skorlarına göre kurulmuştur. PLS: Partial Least Squares, VIF: Variance Inflation Factor.								

Buna göre rs767649 T/A SNP'sinin TA genotipi ve rs11614913 C/T SNP'sinin CT genotipleri bir aradayken rs11614913 CT genotipi hastalık riskiyle ilişkili bulunmuştur ($P=.008$). Kurulan bu modelin uygunluğu Hosmer & Lemeshow testi ile kontrol edildiğinde modelin geçerli olduğu görülmüştür ($P=.41$).

3.2.5.2 Orta düzey EDSS riski (EDSS>3) için yapılan analizler

Bu analizlerde hasta grubunun sahip olduğu klinik bilgilerin ve SNP genotiplerinin orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkisi incelenmiştir. EDSS skoru 3'e eşit veya 3'ten küçük olan hastalar hafif düzey EDSS skoruna, 3'ten büyük hastalar orta düzey EDSS riskine sahip olanlar olarak ikiye ayrılmıştır. Orta düzey EDSS riski (EDSS>3) bağımlı değişken ve EDSS>3 durumu riskli olarak kabul edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin seçimi için PLS kullanılmış olup modellerin doğru bir şekilde

kurgulanması için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiştir. Lojistik regresyon modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan parametrelerin seçimi için yapılan PLS yönteminde tüm parametreler bir arada tutularak incelenmiş olmasına rağmen SNP genotipleri ve genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) birbirleri ile bağımlı olduğu için ayrı ayrı incelenmiştir.

SNP genotiplerinin modelleriyle klinik parametreler bir arada incelendiğinde hastalık süresi, tedavi süresi ve VLDL-kolesterol PLS'e göre bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Daha sonra bu bağımsız değişkenlerin eş lineerlik testi sonucunda VIF skorlarına bakılmıştır. Hastalık süresi ve tedavi süresinin VIF skorları üçten büyük olduğu için hastalık süresi ve VLDL-kolesterolün ve tedavi süresi ve VLDL-kolesterolün birlikte bulunduğu iki ayrı model kurularak lojistik regresyon analizi gerçekleştirilmiş, anlamlı sonuç veren modellerden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.19'da sunulmuştur.

Çizelge 3.19: Grup-1 çalışma popülasyonundaki RRMS hastalarında (n=400) orta düzey EDSS riski (EDSS>3) için yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkili bulunan parametreler.

Model	İlişkili Bulunanlar	OR	%95 CI	P	Doğruluk Oranı (%)	Hosmer & Lemeshow		
						χ^2	df	P
1: Hastalık Süresi, VLDL-Kolesterol	Hastalık süresi	1.229	1.150-1.314	<.001	93.0	9.317	8	.32
	VLDL-Kolesterol (mmol/L)	2.134	1.079-4.222	.03				
2: Tedavi Süresi, VLDL-Kolesterol	Tedavi Süresi	1.238	1.150-1.333	<.001	92.5	5.762	8	.67
	VLDL-Kolesterol (mmol/L)	2.423	1.233-4.762	.01				
Parametrelerin seçimi PLS yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve ilişkili parametrelerin olduğu modeller VIF skorlarına göre kurulmuştur. PLS: Partial Least Squares, VIF: Variance Inflation Factor.								

Buna göre hem hastalık hem de tedavi süresi VLDL-kolesterol ile birlikteyken orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkili bulunmuştur (Hastalık süresi: $P<.001$, Tedavi süresi: $P<.001$). Bunun yanı sıra VLDL-kolesterol de hastalık süresiyle ve tedavi süresiyle bir aradayken orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkili bulunmuştur (VLDL-Kolesterol: Model 1, $P=.03$; Model 2, $P=.01$). Kurulan bu modellerin uygunluğu Hosmer & Lemeshow testi ile kontrol edildiğinde modellerin geçerli olduğu görülmüştür (Model 1: $P=.32$, Model 2: $P=.67$).

3.2.5.3 Hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) için yapılan analizler

Bu analizlerde hasta grubunun sahip olduğu klinik bilgilerin ve SNP genotiplerinin hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkisi incelenmiştir. MSSS değeri 5'e eşit veya 5'ten küçük olan hastalar yavaş MS progresyonuna, 5'ten büyük olan hastalar hızlı MS progresyon riskine sahip olanlar olarak ikiye ayrılmıştır. Hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) bağımlı değişken ve MSSS>5 durumu riskli olarak kabul edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin seçimi için PLS kullanılmış olup modellerin doğru bir şekilde kurgulanması için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiştir. Lojistik regresyon modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan parametrelerin seçimi için yapılan PLS yönteminde tüm parametreler bir arada tutularak incelenmiş olmasına rağmen SNP genotipleri ve genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) birbirleri ile bağımlı olduğu için ayrı ayrı incelenmiştir.

SNP'lerin kodominant modelleriyle klinik parametreler bir arada incelendiğinde rs2910164 GG genotipi, hastalık süresi, trigliserit ve VLDL-kolesterol kolesterol PLS'e göre bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin eş lineerlik testi sonucunda VIF skorlarına bakılmıştır. Trigliserit ve VLDL-kolesterolün VIF skorları üçten büyük olduğu için trigliserit, hastalık süresi ve rs2910164 GG genotipinin; VLDL-kolesterol, hastalık süresi ve rs2910164 GG genotipinin birlikte bulunduğu iki ayrı model kurularak lojistik regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. SNP'lerin resesif modelleriyle klinik parametreler bir arada incelendiğinde hastalık süresi, trigliserit ve VLDL-kolesterol PLS'e göre bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin eş lineerlik testi sonucunda VIF skorlarına bakılmıştır. Trigliserit ve VLDL-kolesterolün VIF skorları üçten büyük olduğu için trigliserit ve hastalık süresi; VLDL-kolesterol ve hastalık süresinin birlikte bulunduğu iki ayrı model kurularak lojistik regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. SNP'lerin dominant modelleriyle klinik parametreler bir arada incelendiğinde rs29210164 GC+CC, hastalık süresi, trigliserit ve VLDL-kolesterol PLS'e göre bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Bu bağımsız değişkenlerin eş lineerlik testi sonucunda VIF skorlarına bakılmıştır. Trigliserit ve VLDL-kolesterolün VIF skorları üçten büyük olduğu için trigliserit, hastalık süresi ve rs2910164 GC+CC genotipi; VLDL-kolesterol, hastalık süresi ve rs2910164 GC+CC genotipinin birlikte bulunduğu iki ayrı model kurularak lojistik regresyon analizi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.20).

Çizelge 3.20: Grup-1 çalışma popülasyonundaki RRMS hastalarında (n=400) hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) için yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunan parametreler.

Model	İlişkili Bulunanlar	OR	%95 CI	P	Doğruluk Oranı (%)	Hosmer & Lemeshow		
						χ^2	df	P
2: rs2910164 GG, Hastalık Süresi, VLDL-Kolesterol	Hastalık Süresi	0.928	0.866-0.995	.04	86.7	9.849	8	.28
	VLDL-Kolesterol (mmol/L)	2.514	1.409-4.487	.002				
3: Hastalık Süresi, Trigliserit	Trigliserit (mmol/L)	1.176	1.008-1.372	.04	86.4	14.453	7	.07
4: Hastalık Süresi, VLDL-Kolesterol	VLDL-Kolesterol (mmol/L)	2.539	1.437-4.486	.001	86.4	15.532	8	.05
5: rs2910164 GC+CC, Hastalık Süresi, Trigliserit	rs2910164 GC+CC	1.829	1.009-3.315	.047	86.4	6.062	8	.64
6: rs2910164 GC+CC, Hastalık Süresi, VLDL-Kolesterol	rs2910164 GC+CC	1.185	1.002-3.326	.049	86.7	8.000	8	.43
	Hastalık Süresi	0.929	0.866-0.996	.04				
	VLDL-Kolesterol (mmol/L)	2.485	1.393-4.932	.002				
Parametrelerin seçimi PLS yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve ilişkili parametrelerin olduğu modeller VIF skorlarına göre kurulmuştur. PLS: Partial Least Squares, VIF: Variance Inflation Factor.								

Buna göre hastalık süresi ($P=.04$) ve VLDL-kolesterol ($P=.002$) rs2910164 G/C SNP'sinin GG genotipiyle bir aradayken hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunmuştur. VLDL-kolesterol ayrıca hastalık süresiyle birlikteyken de MS progresyon riski ile ilişkilidir (Model 4, $P=.001$). Bir başka serum lipit paneli parametresi olan trigliserit de hastalık süresiyle birlikteyken MS progresyon riski ile ilişkili bulunmuştur (Model 3, $P=.04$). rs2910164 SNP'sinin GC veya CC genotipine sahip olma durumu da farklı modellerde, farklı bağımsız değişkenlerle bir aradayken MS progresyon riskiyle ilişkili bulunmuştur (rs2910164 GC+CC: Model 5, $P=.047$; Model 6, $P=.049$). Hastalık süresi ($P=.04$) ve VLDL-kolesterol ($P=.002$) rs2910164 G/C SNP'sinin dominant modeliyle bir aradayken MS progresyon riski ile ilişkili bulunmuştur. Kurulan modellerin uygunluğu Hosmer & Lemeshow testi ile kontrol edildiğinde modellerin geçerli olduğu görülmüştür (Model 2: $P=.28$, Model 3: $P=.07$, Model 4: $P=.05$, Model 5: $P=.64$, Model 6: $P=.43$).

3.3 Grup-2’de Gerçekleştirilen İstatistiksel Analizler

Grup-2’yi oluşturan 30 naif RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrolün ekspresyon seviyesi çalışmaları gerçekleştirildikten sonra her bir birey için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak rölatif miRNA ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. Daha sonra klinik bilgiler ve rölatif miRNA ekspresyon seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Ardından hasta ve kontrol gruplarında SNP genotipleri ve farklı genotip modellerine göre hem gruplar içerisinde hem de gruplar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Bunlara ek olarak naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS grupları kategorik klinik ve demografik verilere göre gruplandırılmış ve gruplar arasında klinik bilgiler ve plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol grupları düşük-yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine göre de ayrılmış, gruplar arasında EDSS, MSSS ve MRG parametreleri karşılaştırılmıştır. Ek olarak hasta ve kontrol gruplarında korelasyon analizleri gerçekleştirilmiş, klinik parametrelerle plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyon incelenmiştir. Son olarak naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları ikili ikili sınıflandırılarak lojistik regresyon analizleri gerçekleştirilmiş, anlamlı çıkan parametrelerin tanısal değerini test etmek için ROC eğrisi çizdirilmiş ve AUC değeri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar ilerleyen bölümlerde detaylarıyla verilmiştir.

3.3.1 Grup-2 çalışma grubunun klinik bilgileri

Grup-2’deki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının klinik bilgileri gruplar için ayrı ayrı sunulmuş ve bu parametreler gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, serum total kolesterol, trigliserit, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol düzeyleri ve sigara içme durumu her üç grup arasında karşılaştırılırken; serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri ve MRG parametreleri hasta grupları arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.21). Hastalar teşhis almalarının ardından tedaviyle birlikte 25-(OH) D₃ takviyesine başlamıştır. Sürekli değişkenler üç grup arasında Kruskal-Wallis *H* testiyle iki grup arasında Mann-Whitney *U* testi ile karşılaştırılmıştır. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılması için Pearson χ^2 testi kullanılmıştır. Örneklem büyüklüklerinin 5’e eşit veya 5’ten az olduğu grupların karşılaştırılmasında Fisher’s Exact test kullanılmıştır.

Çizelge 3.21: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının klinik bilgileri.

	Naif RRMS (n=30)	Fingolimod Alan RRMS (n=29)	Kontrol (n=30)	P
Sigara (Evet), n (%)	10 (33.3)	8 (27.6)	18 (60.0)	.03
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	4.73 ± 1.02	4.69 ± 1.07	4.49 ± 0.80	
medyan (Q1-Q3)	4.51 (4.01-5.13)	4.69 (4.04-5.46)	4.53 (3.91-5.25)	.71
Trigliserit (mmol/L), ortalama ± SS	1.48 ± 0.83	1.74 ± 1.14 ^a	1.10 ± 0.50	
medyan (Q1-Q3)	1.22 (0.84-1.81)	1.33 (1.08-1.85)	0.95 (0.78-1.25)	.009
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	2.64 ± 0.86	2.67 ± 0.81	2.65 ± 0.68	
medyan (Q1-Q3)	2.36 (2.02-3.11)	2.62 (2.15-3.06)	2.74 (2.43-3.13)	.72
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	1.42 ± 0.33	1.42 ± 0.49	1.33 ± 0.37	
medyan (Q1-Q3)	1.42 (1.19-1.58)	1.30 (1.09-1.66)	1.27 (1.09-1.47)	.54
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	0.64 ± 0.36	0.75 ± 0.53	0.50 ± 0.23	
medyan (Q1-Q3)	0.54 (0.36-0.80)	0.57 (0.49-0.78)	0.44 (0.36-0.57)	.05
25-(OH) D₃ (nmol/L), ortalama ± SS	41.59 ± 35.64	23.31 ± 15.98	-	
medyan (Q1-Q3)	30.00 (20.00-53.00)	20.00 (13.00-27.00)	-	.002
Hastalık Süresi (yıl), ortalama ± SS	2.6 ± 4.6	8.2 ± 4.8	-	
medyan (Q1-Q3)	1.0 (1.0-1.0)	6.0 (5.0-12.0)	-	<.001
EDSS, ortalama ± SS	0.95 ± 1.05	1.83 ± 0.96	-	
medyan (Q1-Q3)	1.00 (0.00-1.50)	1.50 (1.00-2.50)	-	.001
EDSS ≤ 3.0, n (%)	29 (96.7)	28 (96.6)	-	
EDSS > 3.0, n (%)	1 (3.3)	1 (3.4)	-	>.99*
MSSS, ortalama ± SS	2.27 ± 1.90	2.63 ± 1.85	-	
medyan (Q1-Q3)	1.78 (0.67-4.30)	2.13 (1.14-3.34)	-	.26
MSSS ≤ 5.00, n (%)	26 (86.7)	25 (86.2)	-	
MSSS > 5.00, n (%)	4 (13.3)	4 (13.8)	-	>.99*
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	15.3 ± 9.3	30.4 ± 15.3	-	
medyan (Q1-Q3)	12.0 (9.0-18.0)	30.0 (19.0-40.0)	-	<.001
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	13.6 ± 8.3	27.8 ± 13.5	-	
medyan (Q1-Q3)	11.5 (9.0-16.0)	27.0 (19.0-36.0)	-	<.001
Kontrast Tutan Lezyon (Var), n (%)	21 (70.0)	4 (13.8)	-	<.001*

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen verilerde çoklu grup karşılaştırmaları Kruskal-Wallis *H* testi ile ikili grup karşılaştırmaları Mann-Whitney *U* testi ile analiz edilmiştir. Post-hoc analizi Mann-Whitney *U* testi ile gerçekleştirilmiştir. ^a: Kontrol grubuyla kıyaslandığında *P*=.006. Post-hoc sonuçları için Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. Frekans ve yüzde olarak gösterilen veriler Pearson χ^2 ile analiz edilmiştir. *: Fisher's Exact test kullanılmıştır. HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

Grup-2’de kontrol grubunda sigara kullanan birey sayısı hasta gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazladır ($P=.03$). Hasta ve kontrol grupları arasında serum total kolesterol ($P=.71$), LDL-kolesterol ($P=.72$), HDL-kolesterol ($P=.54$) ve VLDL-kolesterol ($P=.05$) düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Gruplar arasında serum trigliserit düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (Tüm gruplar arası: $P=.009$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P=.006$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun serum trigliserit düzeyleri kontrol grubunun serum trigliserit düzeylerinden daha yüksektir. Hasta grupları arasında ise MSSS değerleri ($P=.26$), orta düzey EDSS ($EDSS>3$) riski ($P>.99$) ve hızlı MS progresyon ($MSSS>5$) riski ($P>.99$) karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fingolimod alan RRMS hastalarının EDSS değerleri naif RRMS hastalarının EDSS değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ($P=.001$). Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarının hastalık süresi de naif RRMS hastalarının hastalık süresinden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ($P<.001$). Hasta grupları arasında serum 25-(OH) D₃ düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu, naif RRMS grubunun serum 25-(OH) D₃ düzeylerinin fingolimod tedavisi alan RRMS grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.002$). Naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları arasında MRG parametreleri karşılaştırıldığında T1 ve T2 lezyon sayılarının fingolimod alan RRMS hastalarında naif RRMS hastalarına kıyasla istatistiksel olarak daha fazla olduğu görülmüştür (T1 Lezyon sayısı: $P<.001$, T2 Lezyon sayısı: $P<.001$). Son olarak kontrast tutan lezyon varlığı karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark görülmüş, kontrast tutan lezyona sahip birey sayısının naif RRMS grubunda, fingolimod tedavisi alan RRMS grubundakinden istatistiksel olarak daha fazla olduğu belirlenmiştir ($P<.001$).

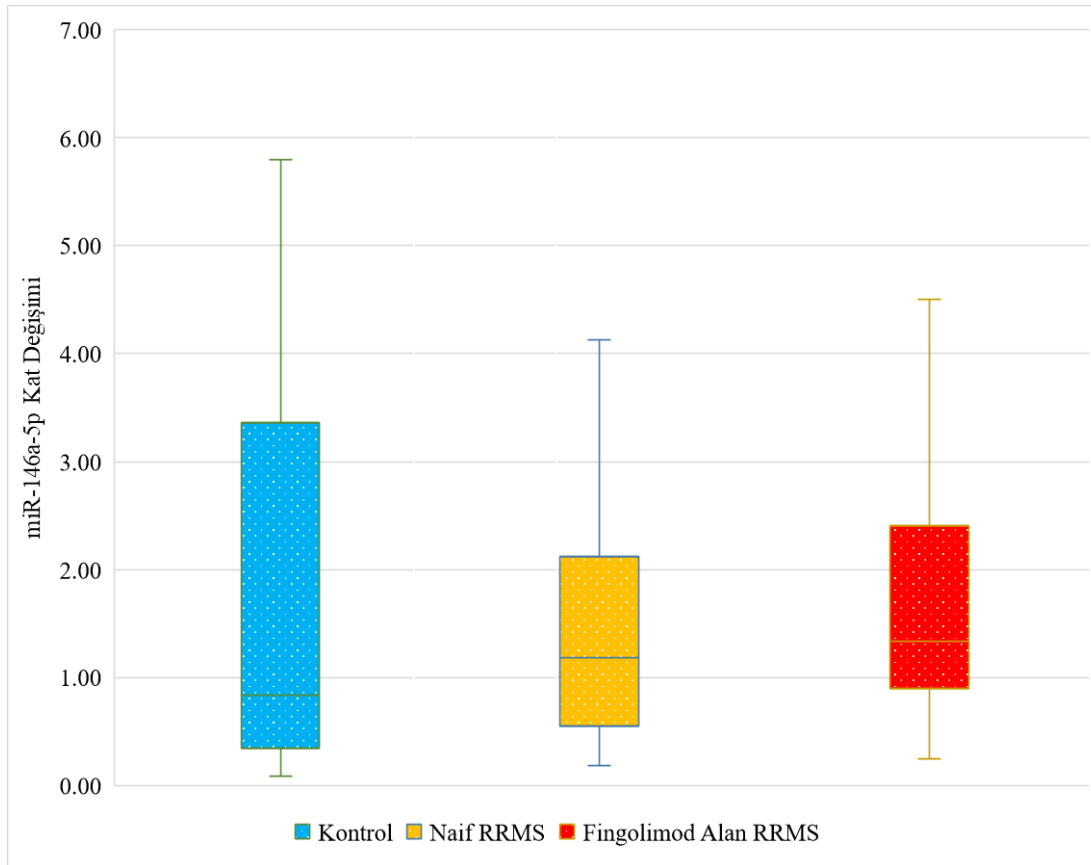
3.3.2 Naif RRMS, fingolimod alan RRMS ve kontrol gruplarında plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri

Gruplar arasında plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri Kruskal-Wallis H testi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlı çıkan sonuçların post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiş, sonuçlar Çizelge 3.22’de ve Şekil 3.2, 3.3 ve 3.4’te sunulmuştur.

Çizelge 3.22: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri.

	Naif RRMS (n=30)	Fingolimod Alan RRMS (n=29)	Kontrol (n=30)	P
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.01 $\pm$ 2.71 1.19 (0.58-2.09)	1.86 $\pm$ 1.80 1.34 (0.90-2.41)	2.61 $\pm$ 3.74 0.84 (0.35-3.27)	.56
miR-155-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.71 $\pm$ 0.73 ^a 0.50 (0.33-0.69)	0.19 $\pm$ 0.29 0.09 (0.06-0.17)	2.37 $\pm$ 4.25 ^a 0.89 (0.47-1.37)	<.001
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.98 $\pm$ 1.65 ^b 1.42 (0.67-3.11)	1.02 $\pm$ 1.15 0.42 (0.18-1.64)	2.18 $\pm$ 2.97 1.03 (0.40-2.97)	.02

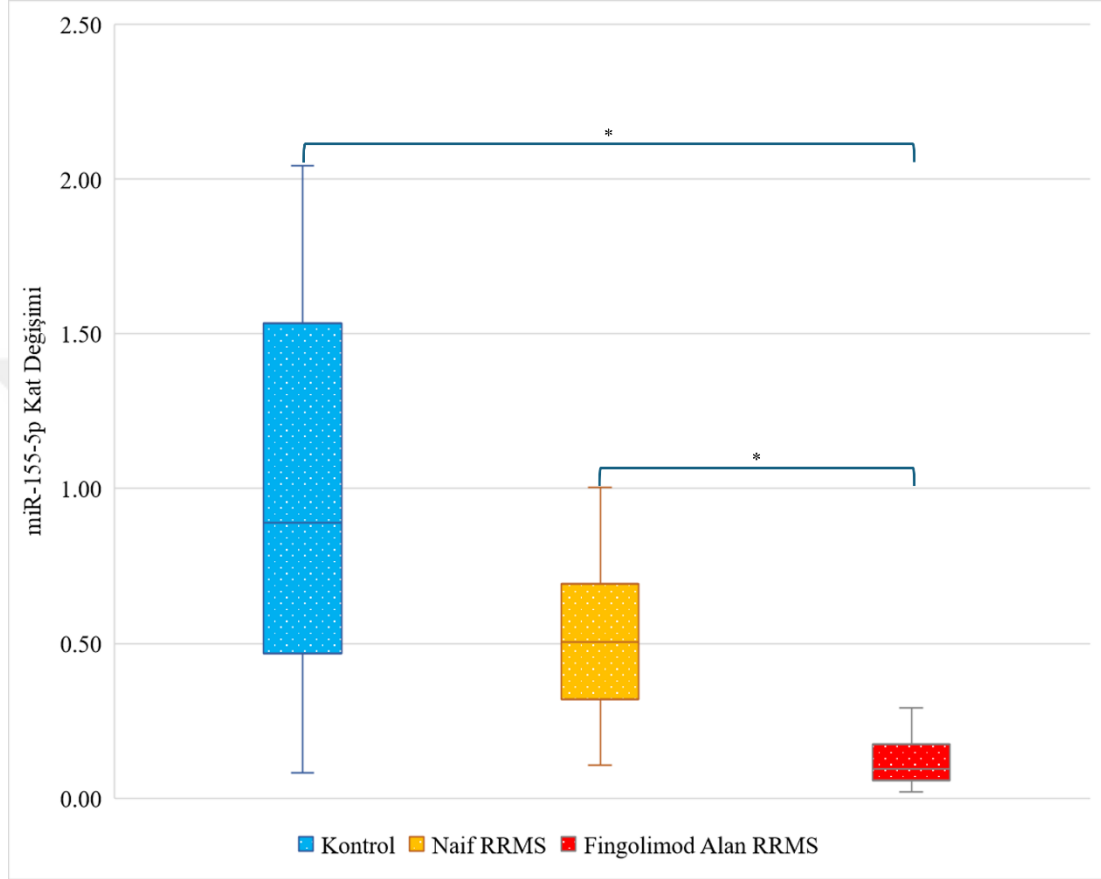
Ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler Kruskal-Wallis *H* testi ile analiz edilmiştir ve *P* değeri hesaplanmıştır. Post-hoc analizi Mann-Whitney *U* testi ile gerçekleştirilmiştir. ^a: Fingolimod grubuyla kıyaslandığında *P*<.001. ^b: Fingolimod grubuyla kıyaslandığında *P*=.02. Post-hoc sonuçları için Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır.



Şekil 3.2: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri.

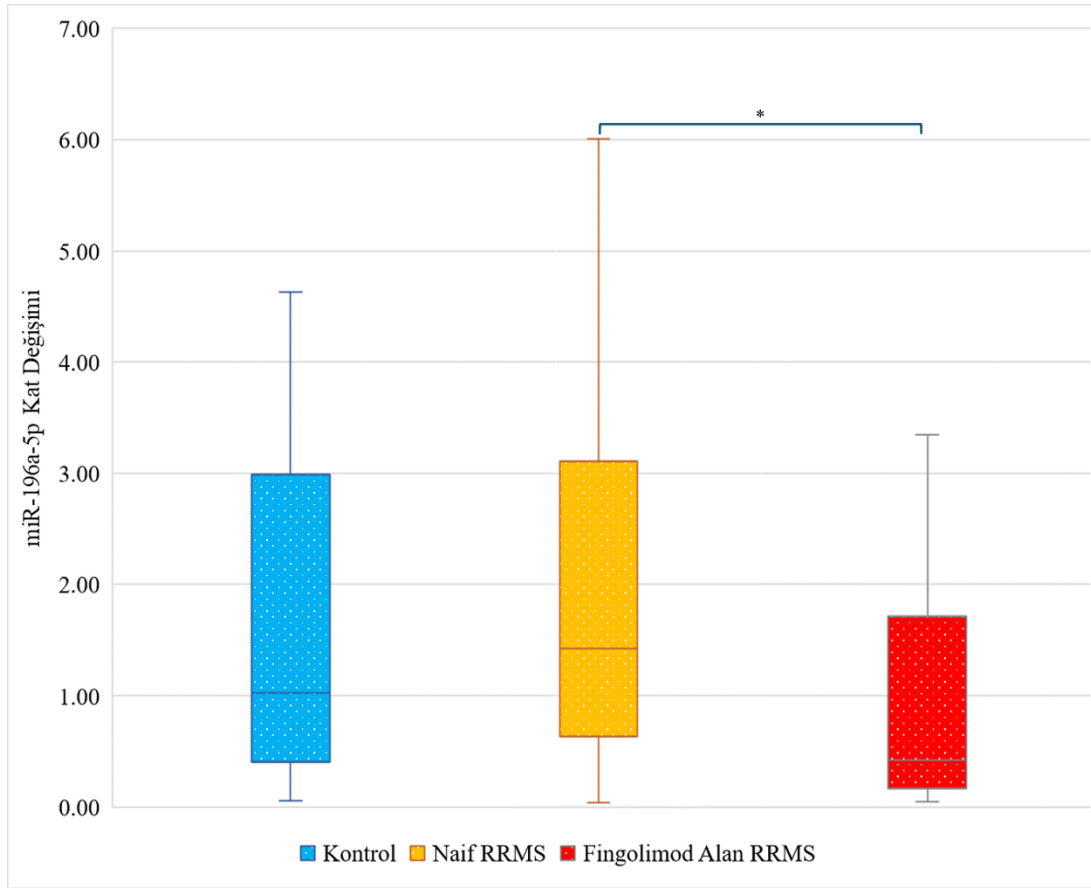
Buna göre, plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır (*P*=.56). Gruplar arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel

olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır (Tüm gruplar arası: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P<.001$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna ve naif RRMS grubuna göre daha düşüktür.



Şekil 3.3: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri (* $P<.001$).

Benzer şekilde miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi bakımından da gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P=.02$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P=.02$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri, naif RRMS grubunun plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktür.



Şekil 3.4: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri (*P=.02).

3.3.3 Plazma miRNA seviyeleri ile miRNA SNP genotipleri arasındaki ilişkiler

Bu bölümde *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve genotip modelleriyle plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi, *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve genotip modelleriyle plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi ve *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve genotip modelleriyle plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi arasındaki ilişkileri incelenmiştir. Bu analizlerde SNP genotip ve genotip modellerine (kodominant, resesif ve dominant) göre hasta ve kontrol grupları arasında ve gruplar içerisinde genotipler arasında karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Üç grup ve üç genotip arasında karşılaştırma için Kruskal-Wallis *H* testi, iki grup ve genotip modelleri (resesif ve dominant) arasında karşılaştırma için Mann-Whitney *U* testi kullanılmıştır. Normal dağılım gösteren verilerin analizi t-test ile gerçekleştirilmiştir. Çoklu grup ve genotipler arasında karşılaştırması anlamlı çıkan sonuçların post-hoc analizleri Mann-Whitney *U* testi ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.1 *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve genotip modellerine (kodominant, resesif ve dominant) göre karşılaştırılmış, sonuçlar  izelge 3.23 ve Şekil 3.5'te sunulmuştur. Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri hem genotip ve genotip modellerine göre hasta ve kontrol grupları içerisinde hem de aynı genotipe sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır.

Grup içi karşılaştırmalara bakıldığında, naif RRMS grubunda GG, GC ve CC genotipine sahip bireyler arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.32$). Yine aynı grupta resesif modele göre CC genotipine sahip bireylerle GG veya GC genotipine sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.23$). Benzer Şekilde dominant modele göre de C alelini taşıyan ve taşımayan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.21$).

Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında kodominant modele göre GG, GC ve CC genotipine sahip bireyler karşılaştırıldığında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.62$). Yine aynı grupta resesif modelde CC genotipine sahip bireylerle GG veya GC genotipine sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.49$). Benzer Şekilde dominant modelde de GC veya CC genotipine sahip bireyler GG genotipine sahip bireylerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.78$).

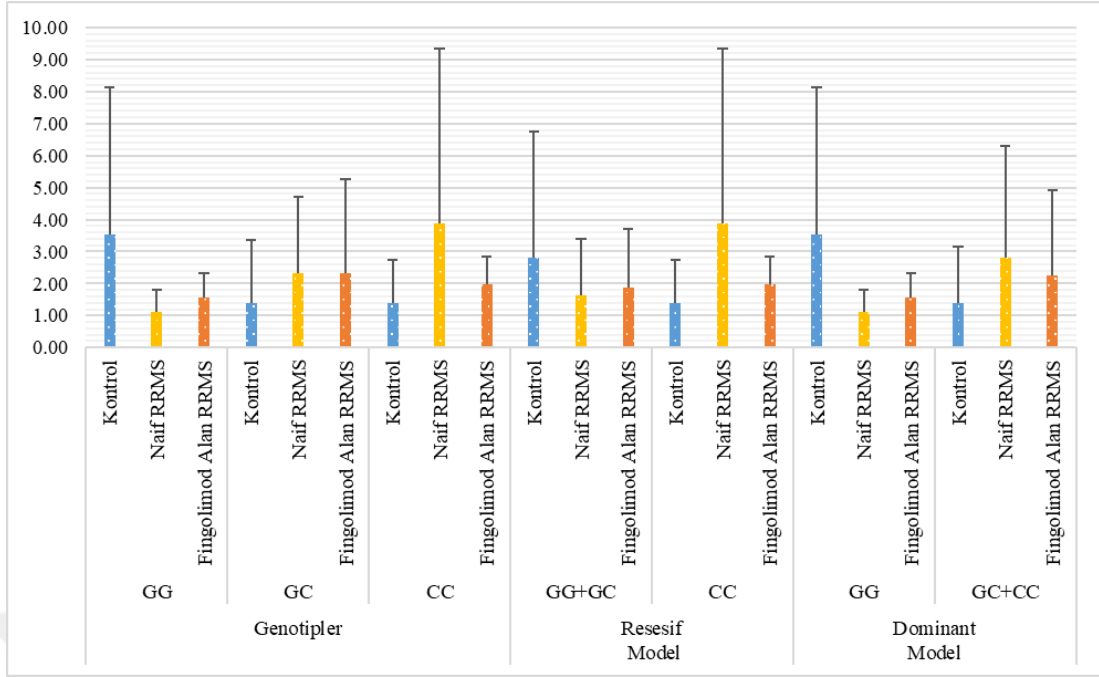
Kontrol grubunda GG, GC ve CC genotipine sahip bireyler arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.48$). Yine aynı grupta resesif modele göre CC genotipine sahip bireylerle GG veya GC genotipine sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.98$). Benzer Şekilde dominant modele göre de C alelini taşıyan ve taşımayan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.28$).

Çizelge 3.23: miR-146a-5p plazma ekspresyon seviyesinin *MIR146A* rs2910164 G/C genotiplerine göre Grup-2 popülasyonunu oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında ve grup içi karşılaştırması.

SNP	Genotip (N/F/K)	Naif RRMS (n=30)	Fingolimod Alan RRMS (n=29)	Kontrol (n=30)	P
Kodominant Model	GG (14/17/17)	1.10 ± 0.70 0.75 (0.45-1.73)	1.58 ± 0.74 1.45 (0.91-2.12)	3.55 ± 4.57 1.93 (0.52-4.96)	.23
	GC (11/10/19)	2.31 ± 2.40 1.33 (0.37-4.13)	2.32 ± 2.93 1.02 (0.39-4.09)	1.38 ± 1.98 0.36 (0.32-0.97)	.27
	CC (5/2/4)	3.89 ± 5.44 1.46 (0.85-2.81)	1.97 ± 0.89 1.97 (1.34-2.60)	1.40 ± 1.34 1.06 (0.46-2.35)	.64
P¹		.32	.62	.48	
Resesif Model	GG+GC (25/27/26)	1.63 ± 1.75 1.16 (0.45-1.96)	1.86 ± 1.85 1.24 (0.89-2.41)	2.80 ± 3.96 0.78 (0.35-3.61)	.64
	CC (5/2/4)	3.89 ± 5.44 1.46 (0.85-2.81)	1.97 ± 0.89 1.97 (1.34-2.60)	1.40 ± 1.34 1.06 (0.46-2.35)	.64
P²		.23	.49	.98	
Dominant Model	GG (14/17/17)	1.10 ± 0.70 0.75 (0.45-1.73)	1.58 ± 0.74 1.45 (0.91-2.12)	3.55 ± 4.57 1.93 (0.52-4.96)	.23
	GC+CC (16/12/13)	2.80 ± 3.51 1.39 (0.83-3.47)	2.26 ± 2.67 1.19 (0.45-3.34)	1.39 ± 1.75 0.59 (0.32-1.42)	.18
P³		.21	.78	.28	

Veriler ilk satırda ortalama ± standart sapma, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) olarak verilmiş olup gruplar arasındaki karşılaştırmalar Kruskal-Wallis *H* testi ile gerçekleştirilmiştir. Aynı grup içindeki karşılaştırmalar *P¹* için Kruskal-Wallis *H* testi ile gerçekleştirilirken, *P²* ve *P³* için Mann-Whitney *U* testi ile gerçekleştirilmiştir. N: Naif RRMS hastaları, F: Fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları, K: Kontrol.

Naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında aynı genotipe sahip bireyler gruplar arasında karşılaştırıldığında GG, GC ve CC genotipine sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamaktadır (GG: *P*=.23; GC: *P*=.27; CC: *P*=.64). Yine gruplar arasında aynı genotipe sahip bireyler karşılaştırıldığında naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında bulunan GG veya GC genotipine sahip bireyler arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*P*=.64). Benzer şekilde GC veya CC genotipine sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (*P*=.18).



Şekil 3.5: Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre dağılımı.

3.3.3.2 *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

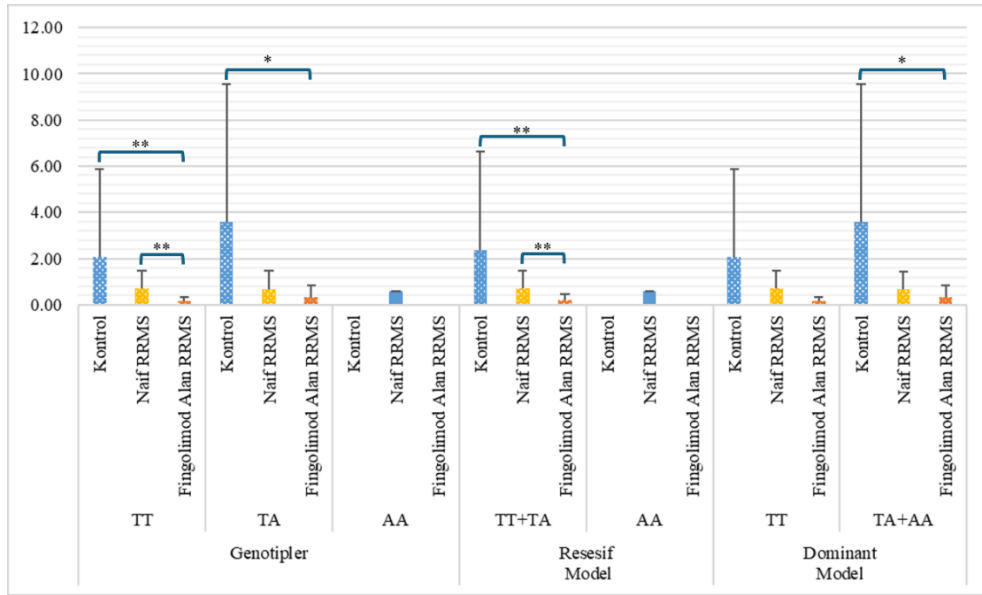
Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve genotip modellerine (kodominant, resesif ve dominant) göre karşılaştırılmış, sonuçlar Çizelge 3.24 ve Şekil 3.6'da sunulmuştur. Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri hem genotip ve genotip modellerine göre hasta ve kontrol grupları içerisinde hem de aynı genotipe sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır.

Grup içi karşılaştırmalara bakıldığında, naif RRMS grubunda AA genotipine sahip bir kişi olduğu için kodominant modelde TT ve TA genotipine sahip bireyler karşılaştırılmış, bireyler arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.86$). Yine aynı grupta resesif modele göre AA genotipinin frekansı bir olduğu için grup için karşılaştırmalar gerçekleştirilememiştir. Dominant model de ise A alelini taşıyan ve taşımayan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.80$).

Çizelge 3.24: miR-155-5p plazma ekspresyon seviyesinin *MIR155* rs76749 T/A genotiplerine göre Grup-2 popülasyonunu oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında ve grup içi karşılaştırması.

SNP	Genotip (N/F/K)	Naif RRMS (n=30)	Fingolimod Alan RRMS (n=29)	Kontrol (n=30)	P
Kodominant Model	TT (19/23/24)	0.73 ± 0.74 ^a 0.48 (0.31-0.69)	0.16 ± 0.19 ^b 0.09 (0.06-0.17)	2.06 ± 3.81 0.89 (0.49-1.28)	<.001
	TA (10/6/6)	0.69 ± 0.78 0.49 (0.33-0.70)	0.32 ± 0.52 ^c 0.10 (0.07-0.23)	3.58 ± 5.97 0.75 (0.42-3.83)	.03
	AA (1/0/0)	0.60	-	-	-
	P¹	.86	-	-	
Resesif Model	TT+TA (29/29/30)	0.72 ± 0.74 ^a 0.48 (0.33-0.69)	0.19 ± 0.29 ^b 0.09 (0.06-0.17)	2.37 ± 4.25 0.89 (0.47-1.37)	<.001
	AA (1/0/0)	0.60	-	-	-
	P²	-	-	-	
Dominant Model	TT (19/23/24)	0.73 ± 0.74 ^a 0.48 (0.31-0.69)	0.16 ± 0.19 ^b 0.09 (0.06-0.17)	2.06 ± 3.81 0.89 (0.49-1.28)	<.001
	TA+AA (11/6/6)	0.69 ± 0.74 0.59 (0.33-0.70)	0.32 ± 0.52 ^c 0.10 (0.07-0.23)	3.58 ± 5.97 0.75 (0.42-3.83)	.03
	P³	.80	.73	>.99	
Veriler ilk satırda ortalama ± standart sapma, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) olarak verilmiş olup gruplar arasındaki karşılaştırmalar Kruskal-Wallis H testi ile gerçekleştirilmiştir. Post-hoc analizleri Mann-Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir. Aynı grup içindeki karşılaştırmalar P¹ ve P³ için Mann-Whitney U testi gerçekleştirilmiştir. ^a : Fingolimod grubu ile karşılaştırıldığında $P<.001$. ^b : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P<.001$. ^c : Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $P=.03$. Post-hoc sonuçları için Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. N: Naif RRMS hastaları, F: Fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları, K: Kontrol.					

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda AA genotipine sahip birey bulunmadığı için kodominant modelde analizler gerçekleştirilmemiştir. Benzer şekilde resesif modele göre de genotipler arasında karşılaştırma, AA genotipine sahip birey bulunmadığı için gerçekleştirilememiştir. Dominant modelde A alelini taşıyan bireyler taşımayanlarla karşılaştırıldığında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi bakımından bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.73$). Kontrol grubunda AA genotipine sahip birey bulunmadığı için kodominant modelde analizler gerçekleştirilmemiştir. Benzer şekilde resesif modele göre de genotipler arasında karşılaştırma, AA genotipine sahip birey bulunmadığı için gerçekleştirilememiştir. Dominant modelde A alelini taşıyan bireyler taşımayanlarla karşılaştırıldığında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi bakımından bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>.99$).



Şekil 3.6: Plazma miR-155-5p rölative ekspresyon seviyelerinin naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre dağılımı (** $P < .001$; * $P = .03$).

Aynı genotipe sahip bireyler gruplar arasında karşılaştırıldığında TT genotipine sahip fingolimod alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölative ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P < .001$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P < .001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P < .001$). Gruplar arasında TA genotipine sahip bireyler karşılaştırıldığında, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölative ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P = .03$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P = .03$). Aynı genotipe sahip bireyler gruplar arasında karşılaştırıldığında TT veya TA genotipine sahip fingolimod alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölative ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P < .001$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P < .001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P < .001$). TA veya AA genotipine sahip bireyler gruplar arasında karşılaştırıldığında TA veya AA genotipine sahip fingolimod alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölative ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P = .03$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P = .03$).

3.3.3.3 *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'si genotip ve genotip modellerine göre plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması

Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve genotip modellerine (kodominant, resesif ve dominant) göre karşılaştırılmış, sonuçlar  izelge 3.25 ve  ekil 3.7'de sunulmuştur. Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri hem genotip ve genotip modellerine göre hasta ve kontrol grupları içerisinde hem de aynı genotipe sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır.

Grup içi karşılaştırmalara bakıldığında, naif RRMS grubunda CC, CT ve TT genotipine sahip bireyler arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.30$). Yine aynı grupta resesif modele göre TT genotipine sahip bireylerle CC veya CT genotipine sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.14$). Benzer şekilde dominant modele göre de T alelini taşıyan ve taşımayan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.77$).

Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında kodominant modele göre CC, CT ve TT genotipine sahip bireyler karşılaştırıldığında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.19$). Resesif modelde TT genotipine sahip bireylerle CC veya CT genotipine sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.08$). Benzer şekilde dominant modelde ise CT veya TT genotipine sahip bireyler CC genotipine sahip bireyler ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.38$).

Kontrol grubunda CC, CT ve TT genotipine sahip bireyler arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.95$). Resesif modele göre TT genotipine sahip bireylerle CC veya CT genotipine sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.93$). Benzer şekilde dominant modelde ise T alelini taşıyan ve taşımayan bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.84$).

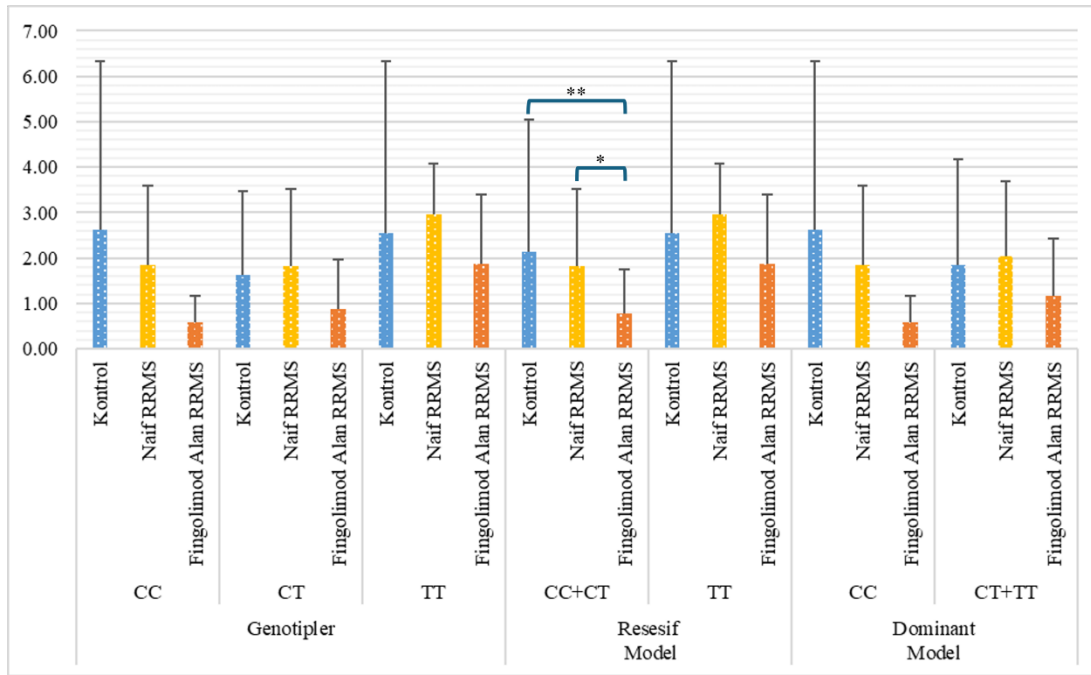
Çizelge 3.25: miR-196a-5p plazma ekspresyon seviyesinin *MIR196A2* rs11614913 C/T genotiplerine göre Grup-2 popülasyonunu oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında ve grup içi karşılaştırması.

SNP	Genotip (N/F/K)	Naif RRMS (n=30)	Fingolimod Alan RRMS (n=29)	Kontrol (n=30)	P
Kodominant Model	CC (9/7/13)	1.84 ± 1.76 1.43 (0.77-2.39)	0.58 ± 0.58 0.35 (0.09-1.06)	2.63 ± 3.71 0.81 (0.20-3.22)	.26
	CT (17/16/13)	1.82 ± 1.69 ^a 1.40 (0.49-2.22)	0.89 ± 1.08 ^b 0.37 (0.17-1.17)	1.62 ± 1.85 1.11 (0.77-1.75)	.04
	TT (4/6/4)	2.97 ± 1.12 3.27 (2.25-3.70)	1.87 ± 1.53 1.80 (0.37-2.86)	2.55 ± 3.79 0.91 (0.30-4.80)	.52
	P¹	.30	.19	.95	
Resesif Model	CC+CT (26/23/26)	1.83 ± 1.68 ^c 1.41 (0.52-2.39)	0.79 ± 0.95 ^d 0.35 (0.16-1.06)	2.13 ± 2.92 1.03 (0.50-2.97)	.01
	TT (4/6/4)	2.97 ± 1.12 3.27 (2.25-3.70)	1.87 ± 1.53 1.80 (0.37-2.86)	2.55 ± 3.79 0.91 (0.30-4.80)	.52
	P²	.14	.08	.93	
Dominant Model	CC (9/7/13)	1.84 ± 1.76 1.43 (0.77-2.39)	0.58 ± 0.58 0.35 (0.09-1.06)	2.63 ± 3.71 0.81 (0.20-3.22)	.26
	CT+TT (21/22/17)	2.04 ± 1.64 1.42 (0.52-3.12)	1.16 ± 1.26 0.56 (0.18-1.82)	1.84 ± 2.33 1.11 (0.68-1.75)	.06
	P³	.77*	.38	.84	

Veriler ilk satırda ortalama ± standart sapma, ikinci satırda medyan (Q1-Q3) olarak verilmiş olup gruplar arasındaki karşılaştırmalar Kruskal-Wallis *H* testi ile gerçekleştirilmiştir. Post-hoc analizleri Mann-Whitney *U* testi ile gerçekleştirilmiştir. Aynı grup içindeki karşılaştırmalar *P¹* için Kruskal-Wallis *H* testi ile gerçekleştirilirken, *P²* ve *P³* için normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney *U* testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve *P* değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. ^a: Fingolimod grubu ile karşılaştırıldığında *P*=.06. ^b: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *P*=.11. ^c: Fingolimod grubu ile karşılaştırıldığında *P*=.02. ^d: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *P*=.047. Post-hoc sonuçları için Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. N: Naif RRMS hastaları, F: Fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları, K: Kontrol.

Naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında aynı genotipe sahip bireyler gruplar arasında karşılaştırıldığında CC ve TT genotipine sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamaktadır (CC: *P*=.26; TT: *P*=.52). CT genotipine sahip bireylerin plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak gruplar arasında farklı olduğu görülse de post-hoc sonuçları için gerçekleştirilen Bonferroni düzeltmesinden sonra bu fark istatistiksel olarak anlamlılığını kaybetmiştir (Tüm gruplar arası: *P*=.04; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: *P*=.06; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: *P*=.11). CC veya CT genotipine sahip bireyler karşılaştırıldığında, aynı genotipe sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-196a-5p

rölatif ekspresyon seviyesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P=.01$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P=.02$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P=.047$). CC veya CT genotipine sahip fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip naif RRMS ve kontrol gurubuna göre plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi istatistiksel anlamda daha düşüktür. CT veya TT genotipine sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($P=.06$).



Şekil 3.7: Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve genotip modellerine göre dağılımı (** $P=.02$; * $P=.047$).

3.3.4 Demografik ve klinik kategorik parametrelere göre karşılaştırma

Bu bölümde naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS grupları demografik ve klinik kategorik parametrelere göre gruplandırılmış ve oluşturulan bu gruplar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve diğer klinik parametreler karşılaştırılmıştır. Demografik ve klinik kategorik parametrelerin yanı sıra naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS grupları düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerine, EDSS skorlarına ve MSSS düzeylerine göre de gruplandırılmış ve gruplar arasında karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu bölümdeki

analizler naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS gruplarında ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan gruplarda normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arasında karşılaştırması için bağımsız örneklem t-test kullanılırken, en az bir grupta normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arasında karşılaştırması için Mann-Whitney *U* testi kullanılmıştır.

3.3.4.1 Naif RRMS grubunda gerçekleştirilen analizler

Grup-2'deki naif RRMS hastalarının klinik bilgileri demografik ve klinik kategorik parametrelere göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, naif RRMS hastaları kendi içinde cinsiyet (Çizelge 3.26), sigara kullanım durumu (Çizelge 3.27) ve kontrast tutan lezyon varlığına (Çizelge 3.28) göre ikili gruplara ayrılmış, plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri oluşturulan bu gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca serum 25-(OH) D₃ seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları ve MSSS değerleri de düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerine göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.29). Ek olarak hastalar EDSS skorları ve MSSS değerlerinin medyan değerlerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılarak gruplar arasında karşılaştırma analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.30). Son olarak orta düzey EDSS riskine (EDSS>3) ve hızlı MS progresyonu riskine (MSSS>5) göre oluşturulan gruplar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.31).

Cinsiyetler arasında karşılaştırma sonuçları

Naif RRMS hastalarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri cinsiyetler arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.26).

Naif RRMS grubunda cinsiyetler arasında gerçekleştirilen karşılaştırmada plazma miR-146a-5p ($P=.29$), miR-155-5p ($P=.77$) ve miR-196a-5p ($P=.84$) rölatif ekspresyon seviyeleri yönünden kadın ve erkek hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde T1 ($P=.55$) ve T2 ($P=.30$) lezyon sayıları açısından da cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunmamıştır. Cinsiyetler arasında EDSS skorları ($P=.64$), MSSS değerleri ($P=.83$) ve hastalık süreleri de ($P=.55$) karşılaştırılmış, bu parametreler bakımından da kadın ve erkek naif RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Naif RRMS grubunda cinsiyetler arasında serum 25-(OH) D₃ ($P=.32$), total kolesterol ($P=.56$), trigliserit ($P=.07$), LDL-kolesterol ($P=.67$) ve HDL-kolesterol ($P=.07$) düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Cinsiyetler arasında serum VLDL-kolesterol düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ($P=.02$). Buna göre erkek naif RRMS hastalarının serum VLDL-kolesterol düzeyleri kadın hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.26).

Çizelge 3.26: Grup-2’de naif RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin cinsiyetler arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	Cinsiyet		P
	Erkek (n=11)	Kadın (n=19)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS	1.43 $\pm$ 1.60	2.34 $\pm$ 3.17	.29
medyan (Q1-Q3)	0.77 (0.44-2.31)	1.46 (0.65-2.09)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS	0.54 $\pm$ 0.25	0.81 $\pm$ 0.89	.77
medyan (Q1-Q3)	0.59 (0.33-0.70)	0.48 (0.22-0.62)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS	1.90 $\pm$ 1.82	2.03 $\pm$ 1.60	.84*
medyan (Q1-Q3)	1.43 (0.43-3.12)	1.42 (0.77-3.11)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS	17.3 $\pm$ 11.6	14.1 $\pm$ 7.8	.55
medyan (Q1-Q3)	16.0 (8.0-22.0)	12.0 (9.0-16.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS	15.7 $\pm$ 11.7	12.4 $\pm$ 5.6	.30*
medyan (Q1-Q3)	14.0 (7.0-22.0)	11.0 (9.0-14.0)	
EDSS, ortalama $\pm$ SS	0.77 $\pm$ 0.93	1.05 $\pm$ 1.12	.64
medyan (Q1-Q3)	0.00 (0.00-2.00)	1.00 (0.00-1.50)	
MSSS, ortalama $\pm$ SS	2.52 $\pm$ 2.31	2.13 $\pm$ 1.67	.83
medyan (Q1-Q3)	0.67 (0.67-5.24)	2.44 (0.67-3.19)	
Hastalık Süresi (Yıl), ortalama $\pm$ SS	1.1 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 5.6	.55
medyan (Q1-Q3)	1.0 (1.0-1.0)	1.0 (1.0-1.0)	
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	4.87 $\pm$ 1.02	4.64 $\pm$ 1.04	.56*
medyan (Q1-Q3)	4.56 (4.20-5.13)	4.30 (3.78-5.28)	
Trigliserit (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	1.83 $\pm$ 0.94	1.27 $\pm$ 0.69	.07*
medyan (Q1-Q3)	1.74 (0.99-2.31)	1.04 (0.77-1.54)	
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	2.75 $\pm$ 0.88	2.58 $\pm$ 0.86	.67
medyan (Q1-Q3)	2.36 (2.05-3.16)	2.34 (1.99-2.69)	
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	1.28 $\pm$ 0.28	1.51 $\pm$ 0.33	.07*
medyan (Q1-Q3)	1.30 (1.11-1.50)	1.48 (1.22-1.61)	
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	0.84 $\pm$ 0.43	0.53 $\pm$ 0.26	.02*
medyan (Q1-Q3)	0.80 (0.47-1.06)	0.43 (0.36-0.70)	
25-(OH) D₃ (nmol/L), ortalama $\pm$ SS	53.78 $\pm$ 52.90	35.50 $\pm$ 22.53	.32
medyan (Q1-Q3)	32.00 (29.00-62.00)	27.00 (20.00-41.00)	

Ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

Sigara kullanımına göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Naif RRMS hastalarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri sigara kullanan ve kullanmayan hastalar arasında karşılaştırılmış, sonuçlar Çizelge 3.27’de sunulmuştur.

Naif RRMS grubunda sigara kullanım durumuna göre gerçekleştirilen karşılaştırmalarda plazma miR-146a-5p ($P=.60$) ve miR-196a-5p ($P=.65$) rölatif ekspresyon seviyeleri yönünden sigara kullanan ve kullanmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Çizelge 3.27: Grup-2’deki naif RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin sigara kullanım durumuna göre karşılaştırma analizi sonuçları.

	Sigara		P
	Var (n=10)	Yok (n=20)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.75 $\pm$ 1.53 1.51 (0.77-1.96)	2.18 $\pm$ 3.25 1.10 (0.45-2.24)	.60
miR-155-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.89 $\pm$ 0.65 0.68 (0.43-1.00)	0.65 $\pm$ 0.78 0.47 (0.22-0.59)	.04
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.22 $\pm$ 1.72 1.88 (0.83-3.44)	1.91 $\pm$ 1.68 1.42 (0.52-3.11)	.65*
T1 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	12.5 $\pm$ 5.4 12.0 (9.0-14.0)	17.0 $\pm$ 10.8 14.0 (9.0-14.0)	.38
T2 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	11.5 $\pm$ 5.0 11.0 (8.0-14.0)	14.9 $\pm$ 9.8 13.0 (9.0-20.0)	.31*
EDSS, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.90 $\pm$ 0.88 1.00 (0.00-2.00)	1.03 $\pm$ 1.15 1.00 (0.00-1.50)	.98
MSSS, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.22 $\pm$ 1.93 1.78 (0.67-2.44)	2.39 $\pm$ 1.96 2.44 (0.67-4.30)	>.99
Hastalık Süresi (Yıl), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.8 $\pm$ 5.3 1.0 (1.0-1.0)	2.6 $\pm$ 4.4 1.0 (1.0-1.0)	.91
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	5.34 $\pm$ 1.17 4.90 (4.51-6.24)	4.35 $\pm$ 0.76 4.14 (3.76-4.92)	.01*
Trigliserit (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.58 $\pm$ 0.81 1.45 (1.01-1.99)	1.41 $\pm$ 0.87 1.03 (0.80-1.81)	.38
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	3.18 $\pm$ 1.04 2.75 (2.36-4.14)	2.35 $\pm$ 0.61 2.11 (1.89-2.59)	.009
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.29 $\pm$ 0.26 1.31 (1.11-1.45)	1.44 $\pm$ 0.28 1.50 (1.19-1.58)	.19*
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.74 $\pm$ 0.37 0.74 (0.52-0.91)	0.61 $\pm$ 0.36 0.45 (0.36-0.78)	.25
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	51.33 $\pm$ 53.95 33.00 (20.00-56.00)	37.12 $\pm$ 22.92 30.00 (23.00-41.00)	.79

Ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

Sigara içen ve içmeyen kişiler arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüş, sigara kullanmayan kişilerde kullanan kişilere göre daha düşük olduğu bulunmuştur ($P=.04$). MRG parametrelerine bakıldığında T1 ($P=.38$) ve T2 ($P=.31$) lezyon sayıları açısından sigara kullanan ve kullanmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Gruplar arasında EDSS skorları ($P=.98$), MSSS değerleri ($P>.99$) ve hastalık süreleri de ($P=.91$) karşılaştırılmış, bu parametreler bakımından da sigara kullanan ve kullanmayan naif RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Naif RRMS grubunda sigara kullanan ve kullanmayan kişiler arasında serum 25-(OH) D₃ ($P=.79$), trigliserit ($P=.38$), HDL-kolesterol ($P=.19$) ve VLDL-kolesterol ($P=.25$) düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Bu parametrelerin yanı sıra sigara kullanan ve kullanmayan hastalar arasında serum total kolesterol ($P=.01$) ve LDL-kolesterol ($P=.009$) düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. Buna göre her iki lipit parametresinin de serum düzeyleri sigara kullanan naif RRMS hastalarında, sigara kullanmayan naif RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir (Çizelge 3.27).

Kontrast tutan lezyon durumuna göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Naif RRMS hastalarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında karşılaştırılmış, sonuçlar Çizelge 3.28’de sunulmuştur.

Naif RRMS grubunda kontrast tutan lezyon varlığına göre oluşturulan gruplar arasında gerçekleştirilen karşılaştırmada plazma miR-146a-5p ($P=.24$), miR-155-5p ($P=.53$) ve miR-196a-5p ($P=.89$) rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde T1 ($P=.13$) ve T2 ($P=.14$) lezyon sayıları açısından da kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Gruplar arasında EDSS skorları ($P=.82$), MSSS değerleri ($P=.89$) ve hastalık süreleri ($P=.76$) karşılaştırılmış, bu parametreler bakımından da kontrast tutan

lezyonu olan ve olmayan naif RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında serum 25-(OH) D₃ ($P=.24$), total kolesterol ($P=.46$), trigliserit ($P=.48$), LDL-kolesterol ($P=.59$), HDL-kolesterol ($P=.18$) ve VLDL-kolesterol ($P=.87$) düzeyleri karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.28).

Çizelge 3.28: Grup-2'deki naif RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin kontrast tutan lezyon varlığına göre karşılaştırma analizi sonuçları.

	Kontrast Tutan Lezyon		P
	Var (n=9)	Yok (n=21)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.56 $\pm$ 1.79 1.10 (0.45-1.73)	3.05 $\pm$ 4.10 1.68 (0.74-2.81)	.24
miR-155-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.73 $\pm$ 0.70 0.57 (0.33-0.70)	0.67 $\pm$ 0.84 0.43 (0.33-0.60)	.53
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.07 $\pm$ 1.84 1.38 (0.67-3.12)	1.77 $\pm$ 1.15 1.75 (1.42-2.39)	.89
T1 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	16.1 $\pm$ 8.8 13.0 (11.0-17.0)	13.4 $\pm$ 10.7 9.0 (7.0-18.0)	.13
T2 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	14.7 $\pm$ 8.6 12.0 (10.0-17.0)	11.1 $\pm$ 7.6 9.0 (6.0-15.0)	.14
EDSS, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.93 $\pm$ 0.88 1.00 (0.00-1.50)	1.00 $\pm$ 1.41 0.00 (0.00-2.00)	.82
MSSS, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.29 $\pm$ 1.87 2.44 (0.67-4.30)	2.23 $\pm$ 2.10 0.67 (0.67-3.19)	.89
Hastalık Süresi (Yıl), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.4 $\pm$ 4.0 1.0 (1.0-1.0)	3.1 $\pm$ 6.0 1.0 (1.0-1.0)	.76
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	4.82 $\pm$ 1.13 4.53 (3.91-5.35)	4.52 $\pm$ 0.71 4.48 (4.07-5.08)	.46*
Trigliserit (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.55 $\pm$ 0.82 1.33 (0.87-2.04)	1.31 $\pm$ 0.87 1.07 (0.84-1.48)	.48*
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.65 $\pm$ 0.97 2.31 (2.01-2.78)	2.62 $\pm$ 0.57 2.49 (2.23-3.16)	.59
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.48 $\pm$ 0.32 1.48 (1.30-1.58)	1.29 $\pm$ 0.32 1.19 (1.11-1.50)	.18
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.64 $\pm$ 0.35 0.54 (0.36-0.79)	0.66 $\pm$ 0.41 0.54 (0.39-0.91)	.87*
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	45.89 $\pm$ 40.44 32.00 (24.00-56.00)	32.38 $\pm$ 18.51 23.50 (18.50-43.00)	.24

Ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

Düşük-yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerine göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Naif RRMS grubu, miRNA ekspresyon seviyelerine göre gruplandırılmış ve oluşturulan gruplar arasında klinik parametreler karşılaştırılmıştır. Naif RRMS grubuna ait miRNA ekspresyon seviyelerinin medyan değerleri sınır değer olarak belirlenmiş, rölatif ekspresyon seviyesi sınır değerine eşit ve üzerinde olan bireyler

yüksek; sınır değerinin altında olan bireyler ise düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak kategorize edilmiştir. Ardından düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerine sahip bireyler arasında serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, MRG parametreleri, EDSS skorları ve MSSS değerleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.29).

Çizelge 3.29: Grup-2'deki naif RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değeri olarak belirlenen sınır değerine göre düşük ve yüksek miRNA ekspresyon seviyelerine sahip bireyler arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	miR-146a-5p Kat Değişimi		P
	Düşük (<1.19) (n=15)	Yüksek (≥1.19) (n=15)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	15.0 ± 10.0	15.0 ± 9.0	.97
medyan (Q1-Q3)	12.0 (9.0-18.0)	12.0 (9.0-21.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	14.0 ± 10.0	13.0 ± 6.0	.75*
medyan (Q1-Q3)	10.0 (8.0-17.0)	12.0 (9.0-16.0)	
EDSS, ortalama ± SS	0.80 ± 0.92	1.10 ± 1.17	.51
medyan (Q1-Q3)	1.00 (0.00-1.50)	1.00 (0.00-2.00)	
MSSS, ortalama ± SS	2.20 ± 1.81	2.34 ± 2.05	.81
medyan (Q1-Q3)	2.44 (0.67-4.30)	1.12 (0.67-4.30)	
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	35.50 ± 24.35	46.47 ± 42.84	.46
medyan (Q1-Q3)	29.50 (21.50-36.00)	33.00 (20.00-61.00)	
	miR-155-5p Kat Değişimi		P
	Düşük (<0.50) (n=15)	Yüksek (≥0.50) (n=15)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	16.0 ± 10.0	14.0 ± 9.0	.49*
medyan (Q1-Q3)	14.0 (10.0-20.0)	12.0 (8.0-16.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	15.0 ± 9.0	12.0 ± 7.0	.22
medyan (Q1-Q3)	14.0 (9.0-17.0)	10.0 (7.0-14.0)	
EDSS, ortalama ± SS	0.90 ± 0.83	1.00 ± 1.25	.87
medyan (Q1-Q3)	1.00 (0.00-1.50)	1.00 (0.00-2.00)	
MSSS, ortalama ± SS	2.36 ± 2.03	2.19 ± 1.84	.84
medyan (Q1-Q3)	1.12 (0.67-4.30)	2.44 (0.67-3.19)	
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	34.64 ± 16.79	49.08 ± 48.26	.62
medyan (Q1-Q3)	29.50 (20.00-53.00)	32.00 (24.00-39.00)	
	miR-196a-5p Kat Değişimi		P
	Düşük (<1.42) (n=14)	Yüksek (≥1.42) (n=16)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	14.0 ± 7.0	16.0 ± 11.0	>.99
medyan (Q1-Q3)	12.0 (10.0-17.0)	13.0 (9.0-20.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	13.0 ± 6.0	14.0 ± 10.0	.98
medyan (Q1-Q3)	11.0 (9.0-17.0)	13.0 (9.0-16.0)	
EDSS, ortalama ± SS	0.57 ± 0.73	1.28 ± 1.18	.10
medyan (Q1-Q3)	0.00 (0.00-1.00)	1.00 (0.00-2.00)	
MSSS, ortalama ± SS	1.57 ± 1.38	2.89 ± 2.12	.09
medyan (Q1-Q3)	0.67 (0.67-2.44)	2.44 (0.67-4.91)	
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	38.58 ± 26.51	44.00 ± 42.34	.65
medyan (Q1-Q3)	28.50 (19.50-54.50)	33.00 (23.00-41.00)	

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃. Naif RRMS grubunda plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin medyan değerleri sınır değer olarak seçilmiştir. Düşük miR-146a-5p <1.19 ve yüksek miR-146a-5p ≥1.19, düşük miR-155-5p <0.50 ve yüksek miR-155-5p ≥0.50, düşük miR-196a-5p <1.42 ve yüksek miR-196a-5p ≥1.42 sınır değerlerine göre ayrılmıştır.

Naif RRMS grubuna ait plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin bu grupta medyan değeri olan 1.19 sınır değeri olarak seçilmiş, bu değere eşit ve üzerinde ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler yüksek, bu değerin altında ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak gruplandırılmıştır. Benzer şekilde plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin bu grupta medyan değeri olan 0.50 sınır değeri olarak seçilmiş, bu değere eşit ve üzerinde ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler yüksek, bu değerin altında ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak gruplandırılmıştır. Bir diğer miRNA olan miR-196a-5p'nin de bu grupta medyan değeri olan 1.42 sınır değeri olarak seçilmiş, bu değere eşit ve üzerinde ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler yüksek, bu değerin altında ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak gruplandırılmıştır. Serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, T1 ve T2 lezyon sayıları, EDSS skorları ve MSSS değerleri düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip bireyler arasında karşılaştırılmıştır.

Gruplar arasında karşılaştırma sonuçlarına göre, her üç miRNA için de serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, T1 ve T2 lezyon sayıları, EDSS skorları ve MSSS değerleri bakımından düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (izelge 3.29).

Medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılan EDSS skorları ve MSSS değerlerine göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Naif RRMS grubu, EDSS skorlarına ve MSSS değerlerine göre gruplandırılmış ve oluşturulan gruplar arasında klinik parametreler karşılaştırılmıştır. Naif RRMS grubunda EDSS skorlarının ve MSSS değerlerinin medyan değerleri sınır değer olarak belirlenmiş, EDSS ve MSSS değeri sınır değerine eşit ve üzerinde olan bireyler ve sınır değerinin altında olan bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Ardından bu gruplar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, T1 ve T2 lezyon sayıları karşılaştırılmıştır (izelge 3.30).

Naif RRMS grubuna ait EDSS skorlarının bu grupta medyan değeri olan 1.00 sınır değeri olarak seçilmiş, naif RRMS grubu bu değere eşit ve üzerinde EDSS skoruna

sahip olan bireyler ve bu değerin altında EDSS skoruna sahip olan bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Benzer şekilde MSSS değerlerinin de bu grupta medyan değeri olan 1.78 sınır değeri olarak seçilmiş, naif RRMS grubu bu değere eşit ve üzerinde MSSS değerine sahip olan bireyler ve bu değerin altında MSSS değerine sahip olan bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, T1 ve T2 lezyon sayıları medyan değerine göre belirlenmiş sınır değerinden ayrılan EDSS ve MSSS grupları arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.30).

Çizelge 3.30: Grup-2'deki naif RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılan EDSS ve MSSS değerleri arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	EDSS		P
	EDSS<1.00 (n=13)	EDSS≥1.00 (n=17)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.92 ± 2.19	2.07 ± 3.11	.93
medyan (Q1-Q3)	1.16 (0.58-2.24)	1.33 (0.65-1.69)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.65 ± 0.68	0.76 ± 0.78	.87
medyan (Q1-Q3)	0.57 (0.31-0.70)	0.48 (0.33-0.62)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.70 ± 1.90	2.20 ± 1.46	.15
medyan (Q1-Q3)	0.83 (0.38-2.41)	1.97 (1.38-3.11)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	13.0 ± 6.0	17.0 ± 11.0	.59
medyan (Q1-Q3)	12.0 (9.0-16.0)	12.0 (10.0-20.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	12.0 ± 6.0	15.0 ± 10.0	.41*
medyan (Q1-Q3)	11.0 (8.0-14.0)	12.0 (9.0-17.0)	
	MSSS		
	MSSS<1.78 (n=15)	MSSS≥1.78 (n=15)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.89 ± 2.03	2.12 ± 3.32	.81
medyan (Q1-Q3)	1.22 (0.58-2.24)	1.10 (0.45-2.09)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.62 ± 0.64	0.80 ± 0.82	.74
medyan (Q1-Q3)	0.48 (0.31-0.70)	0.53 (0.33-0.69)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.77 ± 1.80	2.19 ± 1.52	.22
medyan (Q1-Q3)	1.03 (0.38-3.11)	1.97 (0.87-3.12)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	13.0 ± 6.0	17.0 ± 12.0	.65
medyan (Q1-Q3)	12.0 (9.0-16.0)	12.0 (10.0-21.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	12.0 ± 5.0	15.0 ± 11.0	.38*
medyan (Q1-Q3)	11.0 (8.0-14.0)	12.0 (9.0-20.0)	

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score. EDSS<1.00 ve EDSS≥1.00, MSSS<1.78 ve MSSS≥1.78 medyan değerlerine göre belirlenen sınır değerlerinden ayrılmıştır.

Naif RRMS grubunda medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılan EDSS ve MSSS değerlerine sahip bireyler arasında karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında EDSS<1.00 ve EDSS≥1.00 skoruna sahip bireyler arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde naif RRMS grubu, bu gruptaki MSSS değerlerinin medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ikiye ayrılarak

gruplandırıldığında MSSS<1.78 ve MSSS≥1.78 değerlerine sahip bireyler arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.30).

Orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ve hızlı MS progresyon riskine (MSSS>5) göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Naif RRMS grubunda EDSS skoru 3'e eşit veya 3'ten küçük olan hastalar hafif düzey EDSS skoruna, 3'ten büyük hastalar orta düzey EDSS riskine sahip olanlar olarak; MSSS değeri 5'e eşit veya 5'ten küçük olan hastalar yavaş MS progresyonuna, 5'ten büyük olan hastalar hızlı MS progresyon riskine sahip olanlar olarak ikiye ayrılmıştır. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri orta düzey EDSS (EDSS>3) riskine sahip olan, olmayan ve hızlı MS progresyon (MSSS>5) riskine sahip olan, olmayan bireyler arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.31).

Çizelge 3.31: Grup-2'deki naif RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin orta düzey EDSS (EDSS>3) riskine sahip olan, olmayan ve hızlı MS progresyon (MSSS>5) riskine sahip olan, olmayan hastalar arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	EDSS		P
	Hafif düzey (EDSS≤3.00)(n=29)	Orta düzey (EDSS>3.00)(n=1)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.61 ± 1.65	13.51	.07
medyan (Q1-Q3)	1.16 (0.58-1.96)		
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.72 ± 0.74	0.53	>.99
medyan (Q1-Q3)	0.48 (0.33-0.69)		
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.97 ± 1.68	2.39	.67
medyan (Q1-Q3)	1.42 (0.67-3.11)		
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	14.5 ± 8.4	38.0	.13
medyan (Q1-Q3)	12.0 (9.0-17.0)		
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	13.1 ± 8.0	28.0	.13
medyan (Q1-Q3)	11.0 (9.0-15.0)		
	MSSS		P
	Yavaş progresyon (MSSS≤5.00)(n=26)	Hızlı progresyon (MSSS>5.00)(n=4)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	2.09 ± 2.88	1.45 ± 1.07	>.99
medyan (Q1-Q3)	1.13 (0.58-2.09)	1.40 (0.76-2.14)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.75 ± 0.77	0.48 ± 0.22	.93
medyan (Q1-Q3)	0.50 (0.33-0.70)	0.51 (0.31-0.64)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.79 ± 1.56	3.22 ± 1.95	.09
medyan (Q1-Q3)	1.39 (0.52-2.41)	2.57 (1.88-4.56)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	16.0 ± 9.5	10.8 ± 7.3	.20
medyan (Q1-Q3)	12.5 (10.0-18.0)	8.5 (5.5-16.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	14.4 ± 8.6	9.0 ± 5.0	.16
medyan (Q1-Q3)	12.0 (9.0-17.0)	7.5 (5.5-12.5)	
Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir ve P değeri hesaplanmıştır. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score.			

Grup-2 popülasyonunda bulunan naif RRMS grubundaki orta düzey EDSS ($EDSS > 3$) riskine sahip hastalarla hafif düzey EDSS skoruna sahip hastalar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, T1 ve T2 lezyon sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu hasta grubunda hızlı MS progresyonu ($MSSS > 5$) riskine ve yavaş MS progresyonuna sahip bireyler arasında da plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, T1 ve T2 lezyon sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.31).

3.3.4.2 Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda gerçekleştirilen analizler

Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarının klinik bilgileri demografik ve klinik kategorik parametrelere göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları kendi içinde cinsiyet (Çizelge 3.32), sigara kullanım durumu (Çizelge 3.33) ve kontrast tutan lezyon varlığına (Çizelge 3.34) göre ikili gruplara ayrılmış, plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık ve tedavi süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri oluşturulan bu gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Ayrıca serum 25-(OH) D₃ seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları ve MSSS değerleri de düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerine göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.35). Ek olarak hastalar EDSS skorları ve MSSS değerlerinin medyan değerlerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılarak gruplar arasında karşılaştırma analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.36). Son olarak orta düzey EDSS riskine ($EDSS > 3$) ve hızlı MS progresyonu riskine ($MSSS > 5$) göre oluşturan gruplar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.37).

Cinsiyetler arasında karşılaştırma sonuçları

Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık ve tedavi süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri cinsiyetler arasında karşılaştırılmış, sonuçlar Çizelge 3.32'de sunulmuştur.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda cinsiyetler arasında gerçekleştirilen karşılaştırmada plazma miR-146a-5p ($P=.87$), miR-155-5p ($P=.37$) ve miR-196a-5p ($P=.87$) rölatif ekspresyon seviyeleri yönünden cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Benzer şekilde T1 ($P=.65$) ve T2 ($P=.62$) lezyon sayıları açısından fingolimod tedavisi alan kadın ve erkek RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Cinsiyetler arasında EDSS skorları ($P=.17$), MSSS değerleri ($P=.97$) ve tedavi süreleri de ($P=.07$) karşılaştırılmış, bu parametreler bakımından da fingolimod tedavisi alan kadın ve erkek RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.32).

Çizelge 3.32: Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin cinsiyetler arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	Cinsiyet		P
	Erkek (n=21)	Kadın (n=8)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.02 $\pm$ 1.69 1.82 (0.43-3.41)	1.80 $\pm$ 1.87 1.34 (0.91-2.02)	.87
miR-155-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.27 $\pm$ 0.44 0.11 (0.08-0.18)	0.16 $\pm$ 0.20 0.09 (0.05-0.17)	.37
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.28 $\pm$ 1.67 0.27 (0.14-2.56)	0.92 $\pm$ 0.93 0.60 (0.20-1.52)	.87
T1 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	34.8 $\pm$ 19.9 24.0 (20.0-51.5)	28.8 $\pm$ 13.4 30.0 (18.0-38.0)	.65
T2 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	31.8 $\pm$ 17.0 22.0 (20.0-45.0)	26.3 $\pm$ 12.0 27.0 (18.0-36.0)	.62
EDSS, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.19 $\pm$ 0.70 2.25 (1.75-2.75)	1.69 $\pm$ 1.02 1.50 (1.00-2.50)	.17
MSSS, ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.65 $\pm$ 2.28 1.85 (1.08-3.80)	2.62 $\pm$ 1.73 2.33 (1.28-3.34)	.97*
Hastalık Süresi (Yıl), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	12.5 $\pm$ 5.9 13.5 (9.5-15.5)	6.6 $\pm$ 3.1 6.0 (4.0-9.0)	.01
Tedavi Süresi (Yıl), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	9.0 $\pm$ 4.0 11.0 (4.0-12.0)	6.0 $\pm$ 3.0 5.0 (4.0-8.0)	.07*
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	4.46 $\pm$ 0.94 4.60 (3.83-5.05)	4.78 $\pm$ 1.13 4.71 (4.04-5.46)	.48*
Trigliserit (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.14 $\pm$ 1.63 1.34 (1.18-2.60)	1.58 $\pm$ 0.89 1.32 (1.07-1.82)	.37
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	2.49 $\pm$ 0.70 2.62 (2.11-2.87)	2.74 $\pm$ 0.86 2.54 (2.15-3.19)	.47*
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	1.13 $\pm$ 0.34 1.09 (0.91-1.23)	1.54 $\pm$ 0.50 1.35 (1.19-1.79)	.02
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	0.98 $\pm$ 0.75 0.62 (0.53-1.19)	0.66 $\pm$ 0.40 0.54 (0.49-0.73)	.18
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama $\pm$ SS medyan (Q1-Q3)	29.75 $\pm$ 24.60 20.50 (13.00-43.50)	20.86 $\pm$ 11.07 19.00 (13.00-27.00)	.58

Ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda cinsiyetler arasında hastalık süresi karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($P=.01$). Fingolimod tedavisi alan erkek RRMS hastalarının hastalık geçmişleri, fingolimod tedavisi alan kadın RRMS hastalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha uzundur. Bu grupta serum 25-(OH) D₃ ($P=.58$), total kolesterol ($P=.48$), trigliserit ($P=.37$), LDL-kolesterol ($P=.47$) ve VLDL-kolesterol ($P=.18$) düzeyleri cinsiyetler arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fingolimod tedavisi alan kadın RRMS hastalarının serum HDL-kolesterol düzeylerinin fingolimod tedavisi alan erkek RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.02$) (Çizelge 3.32).

Sigara kullanıma göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri sigara kullanan ve kullanmayan hastalar arasında karşılaştırılmış, sonuçlar Çizelge 3.33'te sunulmuştur.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda sigara kullanım durumuna göre gerçekleştirilen karşılaştırmalarda plazma miR-146a-5p ($P=.35$), miR-155-5p ($P=.06$) ve miR-196a-5p ($P=.23$) rölatif ekspresyon seviyeleri yönünden sigara kullanan ve kullanmayan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. MRG parametrelerine bakıldığında T1 ($P>.99$) ve T2 ($P=.90$) lezyon sayıları açısından sigara kullanan ve kullanmayan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Sigara kullanan ve kullanmayan bireyler arasında EDSS skorları ($P=.35$), MSSS değerleri ($P=.41$), hastalık süreleri ($P=.09$) ve tedavi süreleri ($P=.20$) karşılaştırılmış, bu parametreler bakımından da sigara kullanan ve kullanmayan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda sigara kullanan ve kullanmayan kişiler arasında serum 25-(OH) D₃ ($P=.18$), total kolesterol ($P=.58$), trigliserit ($P=.60$), LDL-kolesterol ($P=.44$), HDL-kolesterol ($P=.18$) ve VLDL-kolesterol ($P=.24$) düzeyleri karşılaştırıldığında, sigara kullanan ve kullanmayan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.33).

Çizelge 3.33: Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin sigara içme durumuna göre karşılaştırma analizi sonuçları.

	Sigara		P
	Var (n=20)	Yok (n=9)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS	2.22 $\pm$ 1.54	1.74 $\pm$ 1.95	.35
medyan (Q1-Q3)	1.97 (0.96-3.50)	1.18 (0.90-2.07)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS	0.34 $\pm$ 0.44	0.13 $\pm$ 0.19	.06
medyan (Q1-Q3)	0.17 (0.09-0.39)	0.08 (0.05-0.13)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama $\pm$ SS	1.69 $\pm$ 1.63	0.79 $\pm$ 0.83	.23
medyan (Q1-Q3)	1.17 (0.27-3.20)	0.40 (0.17-1.35)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS	30.0 $\pm$ 15.8	29.7 $\pm$ 15.4	>.99
medyan (Q1-Q3)	23.0 (19.5-42.5)	30.0 (18.5-37.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama $\pm$ SS	27.5 $\pm$ 13.6	27.1 $\pm$ 13.5	.90
medyan (Q1-Q3)	23.0 (19.5-37.0)	27.0 (18.5-35.0)	
EDSS, ortalama $\pm$ SS	2.00 $\pm$ 0.80	1.65 $\pm$ 0.90	.35*
medyan (Q1-Q3)	2.00 (1.25-2.75)	1.50 (1.00-2.50)	
MSSS, ortalama $\pm$ SS	2.30 $\pm$ 2.10	2.66 $\pm$ 1.78	.41
medyan (Q1-Q3)	1.49 (1.13-2.45)	2.60 (1.21-3.40)	
Hastalık Süresi (Yıl), ortalama $\pm$ SS	11.4 $\pm$ 6.4	6.8 $\pm$ 3.4	.09*
medyan (Q1-Q3)	13.5 (5.5-15.0)	6.0 (4.0-9.0)	
Tedavi Süresi (Yıl), ortalama $\pm$ SS	8.0 $\pm$ 5.0	6.0 $\pm$ 3.0	.20*
medyan (Q1-Q3)	9.0 (5.0-13.0)	5.0 (4.0-9.0)	
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	4.52 $\pm$ 1.23	4.78 $\pm$ 1.05	.58*
medyan (Q1-Q3)	4.53 (3.35-5.61)	4.70 (4.11-5.44)	
Trigliserit (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	2.02 $\pm$ 1.61	1.66 $\pm$ 0.94	.60
medyan (Q1-Q3)	1.34 (1.18-2.13)	1.41 (1.08-1.84)	
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	2.51 $\pm$ 0.95	2.78 $\pm$ 0.76	.44*
medyan (Q1-Q3)	2.58 (1.62-3.17)	2.65 (2.21-3.12)	
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	1.23 $\pm$ 0.39	1.48 $\pm$ 0.51	.18
medyan (Q1-Q3)	1.10 (1.06-1.35)	1.32 (1.17-1.72)	
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama $\pm$ SS	0.93 $\pm$ 0.74	0.70 $\pm$ 0.43	.24
medyan (Q1-Q3)	0.62 (0.53-0.97)	0.56 (0.48-0.75)	
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama $\pm$ SS	32.63 $\pm$ 24.61	19.35 $\pm$ 9.94	.18*
medyan (Q1-Q3)	23.00 (13.00-52.50)	19.00 (12.00-22.50)	

Ortalama $\pm$ standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

Kontrast tutan lezyon durumuna göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarının plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, MRG parametreleri, EDSS skorları, MSSS değerleri, hastalık süreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli düzeyleri kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında karşılaştırılmış, sonuçlar Çizelge 3.34'te sunulmuştur.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda kontrast tutan lezyon varlığına göre gerçekleştirilen karşılaştırmalarda plazma miR-146a-5p ($P=.56$), miR-155-5p ($P=.11$) ve miR-196a-5p ($P=.74$) rölatif ekspresyon seviyeleri yönünden kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

T1 ($P=.83$) ve T2 ($P=.74$) lezyon sayıları açısından da kontrast tutan lezyonu olan ve olmayan hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrast tutan lezyonu bulunan ve bulunmayan bireyler arasında EDSS skorları ($P=.48$), MSSS değerleri ($P=.69$), hastalık ($P>.99$) ve tedavi süreleri ($P=.93$) karşılaştırılmış, bu parametreler bakımından kontrast tutan lezyonu bulunan ve bulunmayan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu grupta kontrast tutan lezyonu bulunan ve bulunmayan bireyler arasında serum 25-(OH) D₃ ($P=.20$), total kolesterol ($P=.14$), trigliserit ($P>.99$), LDL-kolesterol ($P=.11$), HDL-kolesterol ($P=.93$) ve VLDL-kolesterol ($P=.65$) düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.34).

Çizelge 3.34: Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında klinik ve deneysel parametrelerin kontrast tutan lezyon varlığına göre karşılaştırma analizi sonuçları.

	Kontrast Tutan Lezyon		P
	Var (n=4)	Yok (n=25)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.19 ± 0.56	1.97 ± 1.91	.56
medyan (Q1-Q3)	1.32 (0.75-1.62)	1.34 (0.90-2.41)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.06 ± 0.01	0.21 ± 0.30	.11
medyan (Q1-Q3)	0.06 (0.05-0.07)	0.10 (0.07-0.18)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.76 ± 1.02	1.06 ± 1.19	.74
medyan (Q1-Q3)	0.32 (0.20-1.32)	0.60 (0.18-1.64)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	29.8 ± 20.9	30.5 ± 14.8	.83
medyan (Q1-Q3)	25.5 (14.5-45.0)	30.0 (21.0-40.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	27.0 ± 18.1	28.0 ± 13.1	.74
medyan (Q1-Q3)	23.0 (14.5-39.5)	27.0 (20.0-36.0)	
EDSS, ortalama ± SS	1.50 ± 0.41	1.88 ± 1.01	.48
medyan (Q1-Q3)	1.50 (1.25-1.75)	2.00 (1.00-2.50)	
MSSS, ortalama ± SS	2.09 ± 1.29	2.71 ± 1.93	.69
medyan (Q1-Q3)	2.29 (1.08-3.11)	2.13 (1.14-3.45)	
Hastalık Süresi (Yıl), ortalama ± SS	9.0 ± 6.4	8.1 ± 4.7	>.99
medyan (Q1-Q3)	9.0 (3.5-14.5)	6.0 (5.0-11.0)	
Tedavi Süresi (Yıl), ortalama ± SS	7.0 ± 5.0	6.0 ± 4.0	.93
medyan (Q1-Q3)	7.0 (3.0-11.0)	5.0 (4.0-9.0)	
Total Kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	4.09 ± 0.90	4.79 ± 1.08	.14
medyan (Q1-Q3)	3.82 (3.47-4.70)	4.71 (4.22-5.46)	
Trigliserit (mmol/L), ortalama ± SS	1.40 ± 0.32	1.79 ± 1.21	>.99
medyan (Q1-Q3)	1.33 (1.21-1.59)	1.34 (1.07-1.89)	
LDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	2.05 ± 0.72	2.77 ± 0.79	.11
medyan (Q1-Q3)	1.85 (1.55-2.54)	2.62 (2.25-3.19)	
HDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	1.40 ± 0.36	1.43 ± 0.51	.93
medyan (Q1-Q3)	1.37 (1.10-1.70)	1.30 (1.09-1.66)	
VLDL-kolesterol (mmol/L), ortalama ± SS	0.64 ± 0.15	0.76 ± 0.57	.65
medyan (Q1-Q3)	0.61 (0.54-0.74)	0.57 (0.49-0.78)	
25-(OH) D₃ (nmol/L), ortalama ± SS	14.75 ± 4.99	24.68 ± 16.75	.20
medyan (Q1-Q3)	14.50 (10.50-19.00)	21.00 (13.00-28.00)	

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir ve P değeri hesaplanmıştır. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, HDL: High density lipoprotein, LDL: Low density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

Düşük-yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerine göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubu, miRNA ekspresyon seviyelerine göre gruplandırılmış ve gruplar arasında klinik parametreler karşılaştırılmıştır. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubuna ait miRNA ekspresyon seviyelerinin medyan değerleri sınır değer olarak belirlenmiş, rölatif ekspresyon seviyesi sınır değerine eşit ve üzerinde olan bireyler yüksek; sınır değerinin altında olan bireyler ise düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak kategorize edilmiştir. Ardından düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerine sahip bireyler arasında serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, MRG parametreleri, EDSS skorları ve MSSS değerleri karşılaştırılmıştır.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubuna ait plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin bu grupta medyan değeri olan 1.34 sınır değeri olarak seçilmiş, bu değere eşit ve üzerinde ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler yüksek, bu değerinin altında ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak gruplandırılmıştır. Benzer şekilde plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin bu grupta medyan değeri olan 0.09 sınır değeri olarak seçilmiş, bu değere eşit ve üzerinde ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler yüksek, bu değerinin altında ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak gruplandırılmıştır. Bir diğer miRNA olan miR-196a-5p'nin de bu grupta medyan değeri olan 0.42 sınır değeri olarak seçilmiş, bu değere eşit ve üzerinde ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler yüksek, bu değerinin altında ekspresyon seviyesine sahip olan bireyler düşük plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip olanlar olarak gruplandırılmıştır. Daha sonra serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, T1 ve T2 lezyon sayıları, EDSS skorları ve MSSS değerleri düşük ve yüksek plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesine sahip bireyler arasında karşılaştırılmıştır.

Fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi sınır değerine göre kategorize edildiğinde serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, MRG parametreleri, EDSS skorları ve MSSS değerleri karşılaştırılmış, düşük ve yüksek plazma miR-146a-5p ekspresyon seviyesine sahip hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.35).

Çizelge 3.35: Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değerine göre belirlenen sınır değerine göre düşük ve yüksek miRNA ekspresyon seviyeleri arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	miR-146a-5p Kat Değişimi		P
	Düşük (<1.34) (n=14)	Yüksek (≥1.34) (n=15)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	30.0 ± 18.0	31.0 ± 13.0	.89*
medyan (Q1-Q3)	28.0 (18.0-40.0)	31.0 (22.0-42.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	27.0 ± 16.0	28.0 ± 12.0	.84*
medyan (Q1-Q3)	24.0 (18.0-36.0)	27.0 (21.0-38.0)	
EDSS, ortalama ± SS	1.57 ± 0.85	2.07 ± 1.02	.17*
medyan (Q1-Q3)	1.50 (1.00-2.00)	2.00 (1.50-3.00)	
MSSS, ortalama ± SS	2.13 ± 1.68	3.09 ± 1.93	.17*
medyan (Q1-Q3)	1.49 (1.13-2.87)	2.91 (1.76-4.55)	
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	21.79 ± 14.71	24.73 ± 17.47	.68
medyan (Q1-Q3)	20.00 (13.00-24.00)	19.00 (11.00-32.00)	
	miR-155-5p Kat Değişimi		
	Düşük (<0.09) (n=14)	Yüksek (≥0.09) (n=15)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	29.0 ± 17.0	32.0 ± 14.0	.69*
medyan (Q1-Q3)	28.0 (18.0-36.0)	31.0 (22.0-44.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	27.0 ± 15.0	29.0 ± 12.0	.64*
medyan (Q1-Q3)	24.0 (18.0-30.0)	31.0 (20.0-40.0)	
EDSS, ortalama ± SS	1.68 ± 0.82	1.97 ± 1.08	.43*
medyan (Q1-Q3)	1.50 (1.00-2.00)	2.00 (1.00-3.00)	
MSSS, ortalama ± SS	2.63 ± 1.89	2.62 ± 1.88	.88
medyan (Q1-Q3)	2.60 (1.28-3.05)	1.99 (1.13-4.55)	
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	14.57 ± 5.35	31.47 ± 18.34	.003*
medyan (Q1-Q3)	13.50 (10.00-20.00)	27.00 (19.00-42.00)	
	miR-196a-5p Kat Değişimi		
	Düşük (<0.42) (n=14)	Yüksek (≥0.42) (n=15)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	30.0 ± 18.0	31.0 ± 13.0	.91*
medyan (Q1-Q3)	26.0 (18.0-36.0)	31.0 (23.0-42.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	28.0 ± 16.0	28.0 ± 12.0	.99*
medyan (Q1-Q3)	24.0 (18.0-34.0)	27.0 (20.0-38.0)	
EDSS, ortalama ± SS	2.07 ± 0.85	1.60 ± 1.02	.19*
medyan (Q1-Q3)	2.00 (1.50-2.50)	1.50 (1.00-2.50)	
MSSS, ortalama ± SS	2.95 ± 1.83	2.33 ± 1.88	.25
medyan (Q1-Q3)	2.87 (1.70-3.45)	1.76 (1.13-3.34)	
25-(OH) D ₃ (nmol/L), ortalama ± SS	19.00 ± 14.25	27.33 ± 16.91	.07
medyan (Q1-Q3)	16.50 (10.00-21.00)	21.00 (14.00-41.00)	

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin medyan değerleri sınır değeri olarak seçilmiştir. Düşük miR-146a-5p <1.34 ve yüksek miR-146a-5p ≥1.34, düşük miR-155-5p <0.09 ve yüksek miR-155-5p ≥0.09, düşük miR-196a-5p <0.42 ve yüksek miR-196a-5p ≥0.42 sınır değerlerine göre ayrılmıştır.

Fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi sınır değerine göre kategorize edildiğinde MRG parametreleri, EDSS skorları ve MSSS değerleri karşılaştırılmış, düşük ve yüksek plazma miR-155-5p ekspresyon seviyesine sahip hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesine göre ayrılan gruplar karşılaştırıldığında serum 25-(OH) D₃ düzeyleri bakımından düşük ve yüksek plazma miR-155-5p ekspresyon seviyesine sahip hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P=.003$). Serum 25-(OH) D₃ seviyelerinin, yüksek plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesine sahip bireylerde, düşük bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür. Fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi sınır değerine göre kategorize edildiğinde serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, MRG parametreleri, EDSS skorları ve MSSS değerleri karşılaştırılmış, düşük ve yüksek plazma miR-196a-5p ekspresyon seviyesine sahip hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ( izelge 3.35).

Medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılan EDSS skorları ve MSSS değerlerine göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubu, EDSS skorlarına ve MSSS değerlerine göre gruplandırılmış ve oluşturulan gruplar arasında klinik parametreler karşılaştırılmıştır. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda EDSS skorlarının ve MSSS değerlerinin medyan değerleri sınır değer olarak belirlenmiş ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları EDSS ve MSSS değerleri sınır değerine eşit ve üzerinde EDSS ve MSS değerine sahip olan bireyler ve sınır değerinin altında EDSS ve MSSS değerine sahip olan bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Ardından bu gruplar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri karşılaştırılmıştır.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubuna ait EDSS skorlarının bu grupta medyan değerleri olan 1.50 sınır değerleri olarak seçilmiş, fingolimod tedavisi alan RRMS grubu bu değere eşit ve üzerinde EDSS skoruna sahip olan bireyler ve bu değerinin altında EDSS skoruna sahip olan bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Benzer şekilde MSSS değerlerinin de bu grupta medyan değerleri olan 2.13 sınır değerleri olarak seçilmiş, fingolimod tedavisi alan RRMS grubu bu değere eşit ve üzerinde MSSS değerine sahip olan bireyler ve bu değerinin altında MSSS değerine sahip olan bireyler olarak iki gruba ayrılmıştır. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, T1 ve T2 lezyon sayıları medyan değerine göre belirlenmiş sınır değerinden ayrılan EDSS ve MSSS grupları arasında karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonuçları  izelge 3.36'da sunulmuştur.

Çizelge 3.36: Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ayrılan EDSS ve MSSS düzeyleri arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	EDSS		P
	EDSS<1.50 (n=9)	EDSS≥ 1.50 (n=20)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.38 ± 0.84	2.08 ± 2.07	.53
medyan (Q1-Q3)	1.11 (0.88-1.77)	1.52 (0.91-2.50)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.16 ± 0.17	0.20 ± 0.33	.80
medyan (Q1-Q3)	0.09 (0.07-0.14)	0.09 (0.05-0.18)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.84 ± 0.89	1.10 ± 1.27	.84
medyan (Q1-Q3)	0.69 (0.42-0.82)	0.33 (0.17-1.80)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	23.0 ± 12.0	34.0 ± 16.0	.09*
medyan (Q1-Q3)	19.0 (12.0-31.0)	31.0 (23.0-45.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	22.0 ± 12.0	31.0 ± 13.0	.10*
medyan (Q1-Q3)	19.0 (12.0-31.0)	28.0 (21.0-39.0)	
	MSSS		
	MSSS<2.13 (n=14)	MSSS≥2.13 (n=15)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.77 ± 1.32	1.95 ± 2.19	.95
medyan (Q1-Q3)	1.18 (0.88-2.41)	1.45 (0.90-2.12)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.24 ± 0.35	0.14 ± 0.21	.16
medyan (Q1-Q3)	0.11 (0.07-0.23)	0.08 (0.05-0.13)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.31 ± 1.41	0.74 ± 0.80	.25
medyan (Q1-Q3)	0.69 (0.35-2.86)	0.29 (0.16-1.64)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	28.0 ± 15.0	33.0 ± 16.0	.39*
medyan (Q1-Q3)	25.0 (18.0-40.0)	30.0 (22.0-44.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	26.0 ± 13.0	30.0 ± 14.0	.46*
medyan (Q1-Q3)	22.0 (18.0-36.0)	27.0 (21.0-40.0)	

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak sunulan normal dağılım göstermeyen veriler Mann-Whitney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler bağımsız örneklem t-testi ile analiz edilmiş ve P değeri hesaplanmıştır. *: Normal dağılım gösteren veriler. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score. EDSS<1.50 ve EDSS≥1.50, MSSS<2.13 ve MSSS≥2.13 medyan değerlerine göre belirlenen sınır değerlerinden ayrılmıştır.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubu, bu gruptaki EDSS skorlarının medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ikiye ayrılarak gruplandırıldığında EDSS<1.50 ve EDSS≥1.50 skoruna sahip bireyler arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, T1 ve T2 lezyon seviyeleri karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde, fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları, bu gruptaki MSSS değerlerinin medyan değerine göre belirlenen sınır değerinden ikiye ayrılarak gruplandırıldığında MSSS<2.13 ve MSSS≥2.13 değerlerine sahip bireyler arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri, T1 ve T2 lezyon sayıları karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.36).

Orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ve hızlı MS progresyon riskine (MSSS>5) göre oluşturulan gruplar arasında karşılaştırma sonuçları

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda EDSS skoru 3'e eşit veya 3'ten küçük olan hastalar hafif düzey EDSS skoruna, 3'ten büyük hastalar orta düzey EDSS riskine sahip olanlar olarak; MSSS değeri 5'e eşit veya 5'ten küçük olan hastalar yavaş MS progresyonuna, 5'ten büyük olan hastalar hızlı MS progresyon riskine sahip olanlar olarak ikiye ayrılmıştır. Daha sonra plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri orta düzey EDSS (EDSS>3) riskine sahip olan, olmayan ve hızlı MS progresyon (MSSS>5) riskine sahip olan, olmayan bireyler arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.37).

Çizelge 3.37: Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda klinik ve deneysel parametrelerin orta düzey EDSS (EDSS>3) riskine sahip olan, olmayan ve hızlı MS progresyon riskine sahip (MSSS>5) olan, olmayan hastalar arasında karşılaştırma analizi sonuçları.

	EDSS		P
	Hafif düzey (EDSS≤3.00)(n=28)	Orta düzey (EDSS>3.00)(n=1)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.88 ± 1.83	1.45	>.99
medyan (Q1-Q3)	1.29 (0.90-2.41)		
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.19 ± 0.29	0.09	>.99
medyan (Q1-Q3)	0.09 (0.06-0.18)		
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.05 ± 1.16	0.09	.14
medyan (Q1-Q3)	0.51 (0.18-1.71)		
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	29.8 ± 15.2	48.0	.28
medyan (Q1-Q3)	28.0 (18.5-39.0)		
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	27.2 ± 13.3	45.0	.21
medyan (Q1-Q3)	25.0 (18.5-36.0)		
	MSSS		
	Yavaş progresyon (MSSS≤5.00)(n=25)	Hızlı progresyon (MSSS>5.00)(n=4)	
miR-146a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.64 ± 1.07	3.29 ± 4.21	>.99
medyan (Q1-Q3)	1.34 (0.91-2.12)	1.74 (0.57-6.01)	
miR-155-5p kat değişimi, ortalama ± SS	0.17 ± 0.27	0.29 ± 0.39	.74
medyan (Q1-Q3)	0.09 (0.06-0.14)	0.13 (0.06-0.53)	
miR-196a-5p kat değişimi, ortalama ± SS	1.02 ± 1.21	0.96 ± 0.89	.83
medyan (Q1-Q3)	0.42 (0.16-1.52)	0.92 (0.19-1.73)	
T1 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	29.3 ± 15.4	37.3 ± 14.6	.34
medyan (Q1-Q3)	26.0 (18.0-38.0)	37.0 (25.5-49.0)	
T2 Lezyon Sayısı, ortalama ± SS	26.9 ± 13.8	33.5 ± 11.0	.25
medyan (Q1-Q3)	23.0 (18.0-36.0)	34.0 (24.5-42.5)	

Ortalama ± standart sapma ve medyan (Q1-Q3) olarak gösterilen veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score.

Grup-2 popülasyonunda bulunan fingolimod tedavisi alan RRMS grubundaki orta düzey EDSS (EDSS>3) riskine sahip hastalarla hafif düzey EDSS skoruna sahip

hastalar arasında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu hasta grubunda yavaş MS progresyonu ve hızlı MS progresyonu (MSSS>5) riskine sahip bireyler arasında da plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri ve MRG parametreleri karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( izelge 3.37).

3.3.5 Korelasyon analizleri

Grup-2'yi oluşturan 30 naif RRMS, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS ve 30 kontrol grubu katılımcısı için korelasyon analizleri gruplar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin diğer klinik parametrelerle olan korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Her üç grupta da ortak olan deneysel ve lipit paneli parametrelerinin yanı sıra naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS gruplarında hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri, T1 lezyon sayıları, T2 lezyon sayıları ve serum 25-(OH) D₃ seviyeleri de analizlere dâhil edilmiştir. Normal dağılıma sahip iki sürekli değişkenin birbirleri ile olan ilişkileri Pearson korelasyon analizi ile incelenmiş ve Pearson korelasyon katsayısı (r) hesaplanmıştır. Parametrelerden en az birinin normal dağılım göstermediği durumda parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri Spearman korelasyon analizi ile incelenmiş ve Spearman korelasyon katsayısı ( ) hesaplanmıştır.

3.3.5.1 Naif RRMS hastalarında yapılan korelasyon analizleri

Grup-2 popülasyonunda bulunan naif RRMS grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin yaş, hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri, T1 lezyon sayıları, T2 lezyon sayıları, serum lipit paneli parametreleri ve 25-(OH) D₃ düzeyleriyle olan ilişkilileri incelenmiştir ( izelge 3.38). Naif RRMS grubunda gerçekleştirilen analizler incelendiğinde plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri arasında bir ilişki bulunmamıştır. Bununla birlikte EDSS skorları ve MSSS değerleriyle de plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri arasında bir ilişki görülmemiştir. MRG parametreleri, serum lipit paneli ve 25-(OH) D₃ düzeyleriyle de plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri arasında bir ilişki bulunmamıştır. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin yanı sıra naif RRMS grubunda EDSS skorlarının ve MSSS değerlerinin diğer klinik parametrelerle olan ilişkileri de incelenmiştir. Bu analizler

sonucunda da EDSS skorları ve MSSS parametreleriyle MRG parametreleri, serum lipit paneli ve 25-(OH) D₃ düzeyleri arasında bir ilişki görülmemiştir (Çizelge 3.38).

Çizelge 3.38: Grup-2 popülasyonundaki naif RRMS grubunda (n=30) gerçekleştirilen korelasyon analizi sonuçları.

		miR-146a-5p Kat Değişimi	miR-155-5p Kat Değişimi	miR-196a-5p Kat Değişimi	EDSS	MSSS
miR-146a-5p	Spearman's ρ	1.000	.147	.357	.056	-.032
	<i>P</i>	.	.44	.05	.77	.87
miR-155-5p	Spearman's ρ	.147	1.000	.223	-.035	-.045
	<i>P</i>	.44	.	.24	.86	.82
miR-196a-5p	Spearman's ρ	.357	.223	1.000	.334	.348
	<i>P</i>	.05	.24	.	.07	.06
Yaş	Spearman's ρ	.229	.178	.151	.304	.075
	<i>P</i>	.22	.35	.43	.10	.69
Hastalık Süresi	Spearman's ρ	.120	.105	-.026	.458	.148
	<i>P</i>	.53	.58	.89	.01	.43
EDSS	Spearman's ρ	.056	-.035	.334	1.000	.907
	<i>P</i>	.77	.86	.07	.	<.001
MSSS	Spearman's ρ	-.032	-.045	.348	.907	1.000
	<i>P</i>	.87	.82	.06	<.001	.
T1 Lezyon	Spearman's ρ	.156	-.109	.092	.119	.045
	<i>P</i>	.41	.57	.63	.53	.82
T2 Lezyon	Spearman's ρ	.173	-.157	.111	.109	.044
	<i>P</i>	.36	.41	.56	.57	.82
Total Kolesterol	Spearman's ρ	.128	.321	-.033	.089	-.027
	<i>P</i>	.51	.09	.87	.65	.89
Trigliserit	Spearman's ρ	.105	.195	.091	.166	.201
	<i>P</i>	.59	.31	.64	.39	.30
LDL Kolesterol	Spearman's ρ	.301	.303	-.051	-.095	-.205
	<i>P</i>	.11	.11	.79	.62	.29
HDL Kolesterol	Spearman's ρ	-.222	-.241	-.113	.020	-.170
	<i>P</i>	.25	.21	.56	.92	.38
VLDL Kolesterol	Spearman's ρ	.042	.367	-.067	.319	.364
	<i>P</i>	.83	.05	.73	.09	.05
25-(OH) D₃	Spearman's ρ	.032	.124	.115	-.095	-.190
	<i>P</i>	.87	.54	.57	.64	.34

EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, LDL: Low density lipoprotein, HDL: High density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

3.3.5.2 Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında yapılan korelasyon analizleri

Grup-2 popülasyonunda bulunan fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin hastalık süresi, tedavi süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri, T1 lezyon sayıları, T2 lezyon sayıları, serum lipit paneli parametreleri ve 25-(OH) D₃ düzeyleriyle olan ilişkileri incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.39'da sunulmuştur.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizleri incelendiğinde plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesiyle plazma miR-146a-5p ($\rho=.596$, $P=.001$) ve plazma miR-196a-5p ($\rho=.556$, $P=.002$) rölatif ekspresyon seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Yine bu grupta plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi ile serum 25-(OH) D₃ düzeyleri arasında da pozitif bir korelasyon bulunmaktadır ($\rho=.521$, $P=.004$). Bu tez çalışması kapsamında incelenen bir diğer miRNA olan miR-196a-5p'nin de plazma rölatif ekspresyon seviyesi plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesiyle fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda pozitif bir korelasyon göstermiştir ($\rho=.527$, $P=.003$). Ayrıca deneysel bir parametre olan plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin klinik parametrelerle olan ilişkine bakıldığında serum total kolesterol ($\rho=.393$, $P=.04$) ve LDL-kolesterol ($\rho=.440$, $P=.02$) düzeyleriyle arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bu parametreler dışında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin korelasyon analizi sonucunda anlamlı olan başka bir parametre bulunmamaktadır.

Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda EDSS skorlarının ve MSSS değerlerinin de plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleriyle ve klinik diğer parametrelerle olan korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonuçlarına da bakıldığında EDSS skorlarıyla T1 ($\rho=.419$, $P=.02$) ve T2 ($\rho=.457$, $P=.02$) lezyon sayılarıyla aralarında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. MRG parametrelerine ek olarak serum total kolesterol düzeyleriyle de EDSS skorları arasında negatif bir korelasyon olduğu görülmüştür ($\rho=-.370$, $P=.048$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda MSSS değerleri de total kolesterol ile negatif bir korelasyon göstermiştir ($\rho=-.413$, $P=.03$). Özetlenen bu sonuçlar dışında fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda EDSS skorları ve MSSS değerlerinin korelasyon analizi sonucunda anlamlı olan başka bir parametre bulunmamaktadır (Çizelge 3.39).

Çizelge 3.39: Grup-2 popülasyonundaki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda (n=29) gerçekleştirilen korelasyon analizleri sonuçları.

		miR-146a-5p Kat Değişimi	miR-155-5p Kat Değişimi	miR-196a-5p Kat Değişimi	EDSS	MSSS
miR-146a-5p	Spearman's ρ	1.000	.596	.527	.169	.145
	<i>P</i>	.	.001	.003	.38	.45
miR-155-5p	Spearman's ρ	.596	1.000	.556	.173	-.041
	<i>P</i>	.001	.	.002	.37	.83
miR-196a-5p	Spearman's ρ	.527	.556	1.000	-.033	-.070
	<i>P</i>	.003	.002	.	.87	.72
Hastalık Süresi	Spearman's ρ	-.099	.170	-.067	.158	-.375
	<i>P</i>	.61	.37	.73	.41	.045
Tedavi Süresi	Spearman's ρ	-.238	.104	-.076	-.022	-.438
	<i>P</i>	.21	.59	.70	.91	.02
EDSS	Spearman's ρ	.169	.173	-.033	1.000	.821
	<i>P</i>	.38	.37	.87	.	<.001
MSSS	Spearman's ρ	.145	-.041	-.070	.821	1.000
	<i>P</i>	.45	.83	.72	<.001	.
T1 Lezyon	Spearman's ρ	.056	.163	.211	.419	.327
	<i>P</i>	.77	.40	.27	.02	.08
T2 Lezyon	Spearman's ρ	.061	.182	.163	.457	.353
	<i>P</i>	.75	.35	.40	.01	.06
Total Kolesterol	Spearman's ρ	-.047	.259	.393	-.370	-.413
	<i>P</i>	.81	.18	.04	.048	.03
Trigliserit	Spearman's ρ	-.334	.028	.193	-.028	-.149
	<i>P</i>	.08	.89	.32	.89	.44
LDL Kolesterol	Spearman's ρ	-.083	.284	.440	-.328	-.358
	<i>P</i>	.67	.14	.02	.08	.06
HDL Kolesterol	Spearman's ρ	.094	-.046	-.043	-.360	-.152
	<i>P</i>	.63	.81	.82	.06	.43
VLDL Kolesterol	Spearman's ρ	-.233	-.003	.202	.072	-.090
	<i>P</i>	.22	.99	.29	.71	.64
25-(OH) D₃	Spearman's ρ	.022	.521	.193	.137	-.049
	<i>P</i>	.91	.004	.32	.48	.80

EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, LDL: Low density lipoprotein, HDL: High density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein, 25-(OH) D₃: 25-Hidroksivitamin D₃.

3.3.5.3 Kontrol grubunda yapılan korelasyon analizleri

Grup-2 popülasyonunda bulunan kontrol grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin serum lipit paneli

parametreleri düzeyleriyle olan ilişkileri incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 3.40'ta sunulmuştur.

Çizelge 3.40: Grup-2 popülasyonundaki kontrol grubunda (n=30) gerçekleştirilen korelasyon analizleri sonuçları.

		Yaş	miR-146a-5p Kat Değişimi	miR-155-5p Kat Değişimi	miR-196a-5p Kat Değişimi
Yaş	Spearman's ρ	1.000	-.146	-.145	-.132
	<i>P</i>	.	.44	.44	.49
miR-146a-5p Kat Değişimi	Spearman's ρ	-.146	1.000	.677	.225
	<i>P</i>	.44	.	<.001	.23
miR-155-5p Kat Değişimi	Spearman's ρ	-.145	.677	1.000	.402
	<i>P</i>	.44	<.001	.	.03
miR-196a-5p Kat Değişimi	Spearman's ρ	-.132	.225	.402	1.000
	<i>P</i>	.49	.23	.03	.
Total Kolesterol	Spearman's ρ	.010	.271	-.026	-.135
	<i>P</i>	.97	.26	.92	.58
Trigliserit	Spearman's ρ	-.259	.090	-.034	.251
	<i>P</i>	.29	.71	.89	.30
LDL Kolesterol	Spearman's ρ	.169	.138	-.130	-.382
	<i>P</i>	.49	.57	.60	.11
HDL Kolesterol	Spearman's ρ	-.067	.180	.069	-.006
	<i>P</i>	.79	.46	.78	.98
VLDL Kolesterol	Spearman's ρ	-.217	.107	-.043	.210
	<i>P</i>	.37	.66	.86	.39

EDSS: Expanded Disability Status Scale, MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score, LDL: Low density lipoprotein, HDL: High density lipoprotein, VLDL: Very low density lipoprotein.

Kontrol grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizi sonuçlarına göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesiyle plazma miR-146a-5p ($\rho=.677$, $P<.001$) ve plazma miR-196a-5p ($\rho=.402$, $P=.03$) rölatif ekspresyon seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Bu parametreler dışında plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin korelasyon analizi sonucunda anlamlı olan başka bir parametre bulunmamaktadır (Çizelge 3.40).

3.3.6 Lojistik regresyon analizleri

Ekspresyon seviyesi çalışmalarının gerçekleştirildiği Grup-2'de sadece naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS gruplarında ortak bulunan ve her üç grupta da ortak olarak bulunan bağımsız değişkenlerin risk durumu olarak belirlenen bağımlı değişken

üzerindeki etkisi ikili lojistik regresyon analizleri ile incelenmiştir. İkili lojistik regresyon analizlerinin gerçekleştirilebilmesi için hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılmıştır (Naif RRMS-Kontrol, Fingolimod Tedavisi Alan RRMS-Naif RRMS ve Fingolimod Tedavisi Alan RRMS-Kontrol). Bu gruplandırma sayesinde bağımlı değişken olarak üç durumdan ikisi seçilmiştir. Burada naif RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizlerde naif RRMS’li hasta olma durumu, fingolimod alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında gerçekleştirilen analizlerde tedavi alma durumu ve fingolimod alan RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizlerde de fingolimod tedavisi alan RRMS’li hasta olma durumu riskli olarak seçilmiş ve bağımlı değişken olarak belirlenmiştir.

Naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS grupları arasında gerçekleştirilen ikili lojistik regresyon analizinde her iki grupta da ortak olarak bulunan cinsiyet, sigara kullanımı bilgisi, EDSS skorları, MRG parametreleri, serum 25-(OH) D₃ ve lipit paneli parametreleri düzeylerine ek olarak bu tez kapsamında çalışılmış olan SNP genotipleri, genotip modelleri ve plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri bağımsız değişkenler olarak kullanılmıştır. Kontrol grubuyla gerçekleştirilen (Naif RRMS-Kontrol ve Fingolimod alan RRMS-Kontrol) ikili regresyon analizlerinde kontrol grubunda ve hasta gruplarında ortak bulunan cinsiyet ve sigara kullanım bilgisine ek olarak SNP genotipleri, genotip modelleri ve plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri bağımsız değişkenler olarak kullanılmıştır.

Model seçiminin tam bağımsız bir şekilde gerçekleştirilmesi için özellik seçim algoritması olarak PLS regresyon kullanılmıştır. Bağımlı değişkendeki varyansı en iyi açıklayan bağımsız değişkenler, lineer latent faktörler üreterek modellenmiş ve bu modellerdeki değişkenler arasında bir önem sıralaması yapılmıştır. Üretilen lineer latent faktörler içerisinde X ve Y düzlemindeki varyansı en iyi şekilde açıklayan latent faktör seçilmiş ve bu latent faktör içerisindeki parametrelerden önem derecesi 1’den büyük olan parametreler modellere dâhil edilmiştir. Analizler arasında belirli tutarsızlıklara yol açılmaması için lojistik regresyon modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan parametrelerin seçimi için yapılan PLS yönteminde tüm parametreler bir arada tutularak incelenmiştir. Buna rağmen SNP genotipleri ve genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) birbirleri ile bağımlı olduğu için ayrı ayrı incelenmiştir.

Modellerin doğru çalışabilmesi için bu tez çalışmasında PLS algoritmasıyla seçilen bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan ilişkileri VIF skorları ile incelenmiştir. VIF skorları için 1 alt sınırken, parametreler arası ilişki arttıkça VIF değerleri de sonsuza doğru artmaktadır. Bu tez çalışmasında modele dâhil edilecek olan parametrelerin VIF skorlarının belirlenmesi için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiş ve VIF skoru 3.0'a eşit ve üzerinde olan parametreler eş lineer olarak belirlenmiştir. Eş lineer olarak belirlenen parametreler kurulan lojistik regresyon modellerine birlikte dâhil edilmemiştir. Bu bağımsız değişkenler birbirlerinden ayrı bir şekilde diğer parametrelerle bir arada olacak şekilde modeller kurulmuştur.

3.3.6.1 Naif RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizler

Bu analizler naif RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilmiştir. Hastalık durumu bağımlı değişken ve RRMS hastaları riskli olarak kabul edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin seçimi için PLS kullanılmış olup modellerin doğru bir şekilde kurgulanması için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiştir. Lojistik regresyon modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan parametrelerin seçimi için yapılan PLS yönteminde tüm parametreler bir arada tutularak incelenmiş olmasına rağmen SNP genotipleri ve genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) birbirleri ile bağımlı olduğu için ayrı ayrı incelenmiştir. SNP genotip modelleriyle deneysel parametreler bir arada incelendiğinde plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi ve sigara kullanımı rs767649 T/A SNP'sinin kodominant ve dominant modelleriyle birlikte PLS'e göre bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Parametreler arasında eş lineerlik görünmediği için lojistik regresyon analizi iki modele göre gerçekleştirilmiş ve anlamlı sonuç veren modelden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.41'de sunulmuştur.

Çizelge 3.41: Grup-2 çalışma popülasyonunda naif RRMS hastaları (n=30) ve kontrol grubu (n=30) arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan model ve hastalık riski ile ilişkili bulunan parametreler.

Model	İlişkili Bulunanlar	OR	%95 CI	P	Doğruluk Oranı (%)	Hosmer & Lemeshow		
						χ^2	df	P
rs767649 TT, miR-155-5p kat değişimi	Sigara	0.304	0.095-0.967	.044	67.8	5.381	8	.72
Parametrelerin seçimi PLS yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve ilişkili parametrelerin olduğu modeller VIF skorlarına göre kurulmuştur. PLS: Partial Least Squares; VIF: Variance Inflation Factor.								

Buna göre rs767649 T/A SNP'sinin kodominant modelinin eklendiği modelde sigara kullanım durumu RRMS hastası olma durumuyla ilişkili bulunmuştur ($P=.044$). Kurulan bu modelin uygunluğu Hosmer & Lemeshow testi ile kontrol edildiğinde modelin geçerli olduğu görülmüştür ($P=.72$).

3.3.6.2 Fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında gerçekleştirilen analizler

Bu analizler fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında gerçekleştirilmiştir. Tedavi alma durumu bağımlı değişken ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları riskli olarak kabul edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin seçimi için PLS kullanılmış olup modellerin doğru bir şekilde kurgulanması için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiştir. Lojistik regresyon modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan parametrelerin seçimi için yapılan PLS yönteminde tüm parametreler bir arada tutularak incelenmiş olmasına rağmen SNP genotipleri ve genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) birbirleri ile bağımlı olduğu için ayrı ayrı incelenmiştir. SNP genotip modelleriyle deneysel parametreler bir arada incelendiğinde MR parametreleri, EDSS skorları, serum 25-(OH) D₃, plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri PLS'e göre bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. T1 ve T2 lezyon sayıları eş lineerlik gösterdiği için lojistik regresyon analizi diğer klinik ve deneysel parametrelerin T1 ve T2 lezyon sayılarıyla ayrı ayrı bulunduğu 2 farklı modele göre gerçekleştirilmiş, anlamlı sonuç veren modellerden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.42'de sunulmuştur.

Buna göre kontrast tutan lezyon varlığı T1 lezyon sayısı, EDSS skorları, serum 25-(OH) D₃, plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle birlikteyken tedavi alma durumuyla ilişkili bulunmuştur ($P=.004$). T2 lezyon sayılarının, EDSS skorları, serum 25-(OH) D₃, plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle birlikte bulunduğu modelde de kontrast tutan lezyon varlığı tedavi alma durumuyla ilişkili bulunmuştur ($P=.005$). Kurulan her iki modelin de uygunluğu Hosmer & Lemeshow testi ile kontrol edilmiş, her iki modelin de geçerli olduğu görülmüştür (Model 1: $P=.80$, Model 2: $P=.96$).

Çizelge 3.42: Grup-2 çalışma popülasyonunda bulunan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları (n=29) ve naif RRMS hastaları (n=30) arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve fingolimod tedavisi alma durumuyla ilişkili bulunan parametreler.

Model	İlişkili Bulunanlar	OR	%95 CI	P	Doğruluk Oranı (%)	Hosmer & Lemeshow		
						χ^2	df	P
1: miR-155-5p kat değişimi, miR-196a2-5p kat değişimi, EDSS, 25-(OH) D ₃ , T1 Lezyon	Kontrast Tutan Lezyon Varlığı	0.078	0.013-0.449	.004	83.9	3.831	7	.80
2: miR-155-5p kat değişimi, miR-196a2-5p kat değişimi, EDSS, 25-(OH) D ₃ , T2 Lezyon	Kontrast Tutan Lezyon Varlığı	0.070	0.011-0.441	.005	82.1	1.968	7	.96
Parametrelerin seçimi PLS yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve ilişkili parametrelerin olduğu modeller VIF skorlarına göre kurulmuştur. PLS: Partial Least Squares; VIF: Variance Inflation Factor.								

3.3.6.3 Fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizleri

Bu analizler fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilmiştir. Tedavi alan RRMS olma durumu bağımlı değişken ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları riskli olarak kabul edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin seçimi için PLS kullanılmış olup modellerin doğru bir şekilde kurgulanması için eş lineerlik testi gerçekleştirilmiştir. Lojistik regresyon modellerinin oluşturulmasında kullanılacak olan parametrelerin seçimi için yapılan PLS yönteminde tüm parametreler bir arada tutularak incelenmiş olmasına rağmen SNP genotipleri ve genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) birbirleri ile bağımlı olduğu için ayrı ayrı incelenmiştir. SNP genotip modelleriyle deneysel parametreler bir arada incelendiğinde sigara kullanımı, plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri rs11614913 C/T genotipi kodominant ve dominant modelleriyle birlikte PLS'e göre bağımsız değişkenler olarak seçilmiştir. Parametreler arasında eş lineerlik görünmediği için lojistik regresyon analizi 2 modele göre gerçekleştirilmiş, anlamlı sonuç veren modellerden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.43'te sunulmuştur.

Buna göre klinik ve deneysel diğer parametrelerin rs11614913 C/T SNP'sinin kodominant ve dominant modelleriyle birlikte bulunduğu her iki modelde de plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin azalmasıyla tedavi alan RRMS olma durumu anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (Model 1: $P=.001$, Model 2: $P=.001$).

Kurulan her iki modelin de uygunluğu Hosmer & Lemeshow testi ile kontrol edilmiş, her iki modelin de geçerli olduğu görülmüştür (Model 1: $P=.19$, Model 2: $P=.18$).

Çizelge 3.43: Grup-2 çalışma popülasyonunda bulunan fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları (n=29) ve kontrol grubu (n=30) arasında yapılan ikili lojistik regresyon analizinde anlamlı çıkan modeller ve fingolimod tedavisi alan RRMS olma durumuyla ilişkili bulunan parametreler.

Model	İlişkili Bulunanlar	OR	%95 CI	P	Doğruluk Oranı (%)	Hosmer & Lemeshow		
						χ^2	df	P
1: rs11614913 CC, Sigara, miR-196a2-5p kat değişimi	miR-155-5p kat değişimi	0.013	0.001-0.180	.001	84.5	11.262	8	.19
2: rs11614913 CT+TT, Sigara, miR-196a2-5p kat değişimi	miR-155-5p kat değişimi	0.013	0.001-0.178	.001	84.5	11.396	8	.18

Parametrelerin seçimi PLS yöntemiyle gerçekleştirilmiş ve ilişkili parametrelerin olduğu modeller VIF skorlarına göre kurulmuştur. PLS: Partial Least Squares; VIF: Variance Inflation Factor.

3.3.7 Receiver operating characteristics (ROC) analizleri

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen gruplar arasında karşılaştırma ve lojistik regresyon analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç veren deneysel parametrelerin tanısal potansiyelinin belirlenmesi ve bir klinik tanı belirteci olarak performanslarının incelenmesi için ROC analizleri gerçekleştirilmiştir. ROC analizleri hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılarak gerçekleştirilmiştir (Naif RRMS-Kontrol, Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS ve Fingolimod alan RRMS-Kontrol). Bu sayede ilişkili parametrelerin iki grubu ayırma becerisi ROC analizi ile değerlendirilmiştir.

ROC eğrisinin eksenlerini ayırıcı parametrenin yanlış pozitif oranı (1-özgüllük) ve doğru pozitif oranı (duyarlılık) oluşturmaktadır. X eksenini 1-özgüllük değerine, Y eksenini de duyarlılık değerine karşılık gelmektedir. Eğri her kesim noktasındaki duyarlılık değerlerinin 1-özgüllük değerine karşı noktalanması ve bu noktaların birleştirilmesiyle elde edilir. Daha sonra elde edilen eğrinin altındaki alandan AUC değeri hesaplanır. AUC değeri, bir tanı testinin hastaları ve sağlıklı bireyleri ayırmadaki doğruluk oranını göstermektedir (Hajian-Tilaki, 2013). Bölüm 2.2.4'te verilmiş başarı ölçeğine göre analizlere devam edilmiştir. AUC değeri orta ve üzeri seviyelerde (orta, iyi veya çok iyi) olduğunda, duyarlılığın ve özgüllüğün toplamının

maksimum değere sahip olduğu noktadaki Youden's Index değerine karşılık gelen miRNA rölatif ekspresyon seviyesi değeri kesme değeri (cut-off) olarak belirlenmiştir.

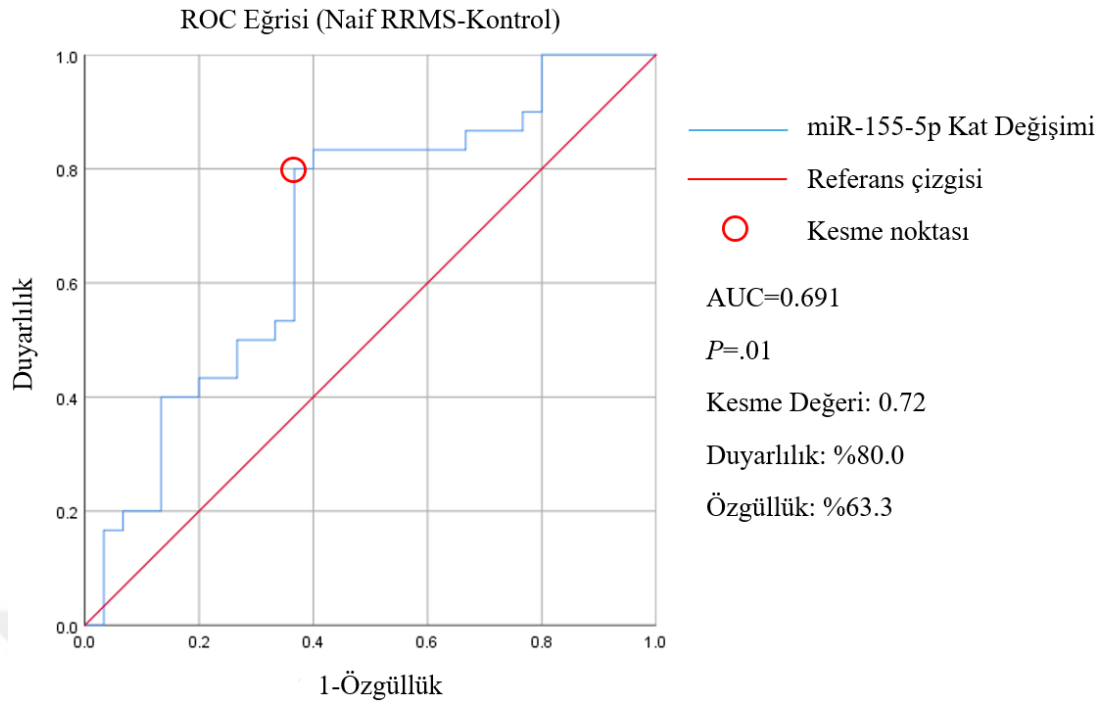
Analizler sırasıyla naif RRMS hastaları ve kontrol gruplarının sınıflandırılması; fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları ve naif RRMS hastalarının sınıflandırılması; fingolimod tedavisi alan RRMS hastaları ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için gerçekleştirilmiştir. Parametre seçimi için ikili lojistik regresyon ve gruplar arasında karşılaştırma analizlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olanlar ve tez kapsamında çalışılan, tez çalışmasının hipotezini oluşturan deneysel parametreler değerlendirilmiştir.

3.3.7.1 Naif RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizler

Daha önce gerçekleştirilen analiz sonuçları göz önünde bulundurulduğunda bu tez kapsamında deneysel olarak çalışılan plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS ve kontrol gruplarını sınıflandırma potansiyelleri değerlendirilmiştir. Plazma miR-146a-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri yönünden naif RRMS ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Naif RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu için plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin ROC analizi eğrisi sonuçları alt başlıkta sunulmuştur.

miR-155-5p'nin naif RRMS hastaları ve kontrol grupları arasındaki ROC analizi

Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi için çizdirilen ROC eğrisi sonucunda, plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS hastaları ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için zayıf derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür ($AUC=0.691$, $P=.01$). Eğrinin koordinat değerleri kullanılarak duyarlılığın ve özgüllüğün toplamının en yüksek değere sahip olduğu noktadaki Youden's Index değerine karşılık gelen miRNA rölatif ekspresyon seviyesi kesme değeri olarak belirlenmiştir. Buna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi 0.72'den düşük olanlar naif RRMS hastası, 0.72'ye eşit ve 0.72'den yüksek olanlar kontrol olarak sınıflandırılmıştır. Bu analizlerin sonucunda duyarlılık %80.0 ve özgüllük değeri %63.3 olarak belirlenmiştir. ROC analizinin eğrisi Şekil 3.8'de sunulmuştur.



Şekil 3.8: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki naif RRMS (n=30) ve kontrol (n=30) sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin eğrisi.

ROC analizlerinin anlamlı sonuç vermesinden dolayı plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Hata matrisi gerçekte ve kesme değerine göre sınıflandırılmış bireylerin sayılarından oluşmaktadır. Buna göre gerçekte ve kesme değerine göre naif RRMS hastası olan 24 kişi doğru pozitif (DP), gerçekte naif RRMS hastası ancak kesme değerine göre kontrol olan 6 kişi yanlış negatif (YN), gerçekte kontrol ancak kesme değerine göre naif RRMS hastası olan 11 kişi yanlış pozitif (YP) ve gerçekte ve kesme değerine göre kontrol olan 19 kişi doğru negatif (DN) olarak ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre hata matrisinden duyarlılık %80.0, özgüllük %63.3 ve doğruluk %71.7 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.44).

Çizelge 3.44: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS ve kontrol grupları arasındaki hata matrisi.

		Gerçek Durum			
Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi <0.72 olduğunda naif RRMS'tir		Naif RRMS	Kontrol	Toplam	
	Tahmin	Naif RRMS	24 (DP)	11 (YP)	35
		Kontrol	6 (YN)	19 (DN)	25
		Toplam	30	30	60

$$\text{Duyarlılık} = [\text{DP}/(\text{DP}+\text{YN})] \times 100 = [24/(24+6)] \times 100 = \%80.0$$

$$\text{Özgüllük} = [\text{DN}/(\text{DN}+\text{YP})] \times 100 = [19/(19+11)] \times 100 = \%63.3$$

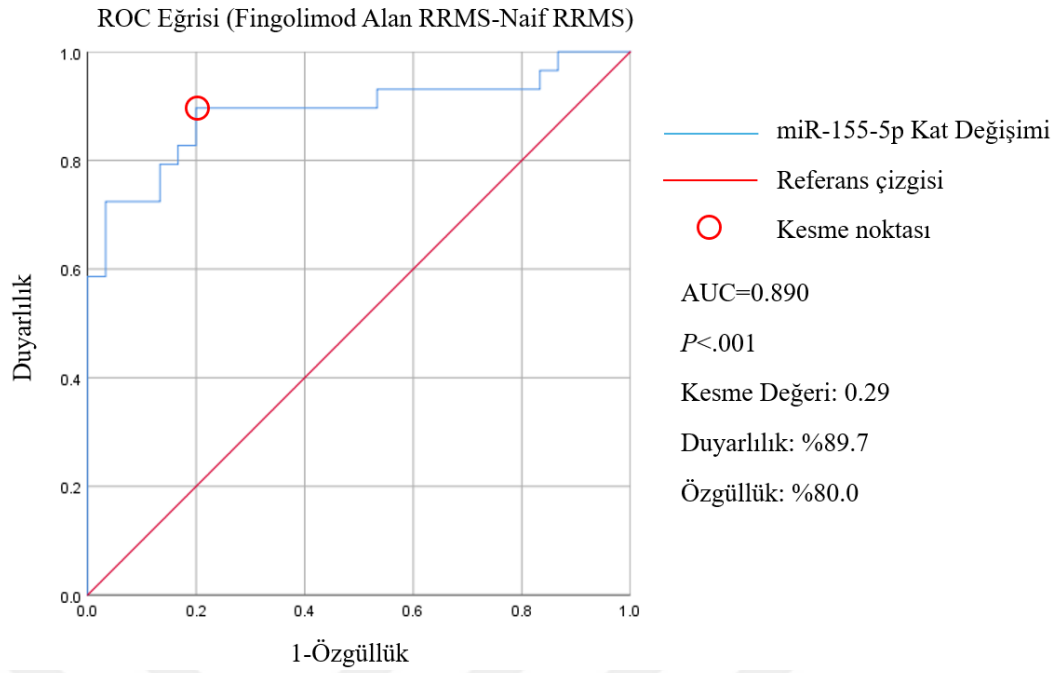
$$\text{Doğruluk} = [(\text{DP}+\text{DN})/(\text{DP}+\text{DN}+\text{YP}+\text{YN})] \times 100 = [(24+19)/(24+19+11+6)] = \%71.7$$

3.3.7.2 Fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında gerçekleştirilen analizler

Daha önce gerçekleştirilen analiz sonuçları göz önünde bulundurulduğunda bu tez kapsamında deneysel olarak çalışılan plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS gruplarını sınıflandırma potansiyelleri değerlendirilmiştir. Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi yönünden fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasında plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış, istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu için plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin ROC analizi eğrileri sonuçları alt başlıklarda sunulmuştur.

miR-155-5p'nin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS hastaları arasındaki ROC analizi

Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi için çizdirilen ROC eğrisi sonucunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin tedavi alan RRMS ve naif RRMS hastaları sınıflandırılması için iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.890, $P<.001$). Eğrinin koordinat değerleri kullanılarak duyarlılığın ve özgüllüğün toplamının en yüksek değere sahip olduğu noktadaki Youden's Index değerine karşılık gelen miRNA rölatif ekspresyon seviyesi kesme değeri olarak belirlenmiştir. Buna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi 0.29'dan düşük olanlar tedavi alan RRMS hastası, 0.29'a eşit ve 0.29'dan yüksek olanlar naif RRMS olarak sınıflandırılmıştır. Bu analizlerin sonucunda duyarlılık %89.7 ve özgüllük değeri %80.0 olarak belirlenmiştir. ROC analizinin eğrisi Şekil 3.9'da sunulmuştur.



Şekil 3.9: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve naif RRMS hastalarının (n=30) sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin eğrisi.

ROC analizlerinin anlamlı sonuç vermesinden dolayı plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Hata matrisi gerçekte ve kesme değerine göre sınıflandırılmış bireylerin sayılarından oluşmaktadır. Buna göre gerçekte ve kesme değerine göre fingolimod tedavisi alan RRMS hastası olan 26 kişi doğru pozitif (DP), gerçekte fingolimod tedavisi alan ancak RRMS kesme değerine göre naif RRMS hastası olan 3 kişi yanlış negatif (YN), gerçekte naif RRMS ancak kesme değerine göre fingolimod tedavisi alan RRMS hastası olan 6 kişi yanlış pozitif (YP) ve gerçekte ve kesme değerine göre naif RRMS hastası olan 24 kişi doğru negatif (DN) olarak ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre hata matrisinden duyarlılık %89.7, özgüllük %80.0 ve doğruluk %84.8 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.45).

Çizelge 3.45: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasındaki hata matrisi.

		Gerçek Durum			
Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi <0.29 olduğunda fingolimod alan RRMS'tir		Fingolimod Alan RRMS	Naif RRMS	Toplam	
	Tahmin	Fingolimod Alan RRMS	26 (DP)	6 (YP)	32
		Naif RRMS	3 (YN)	24 (DN)	27
		Toplam	29	30	59

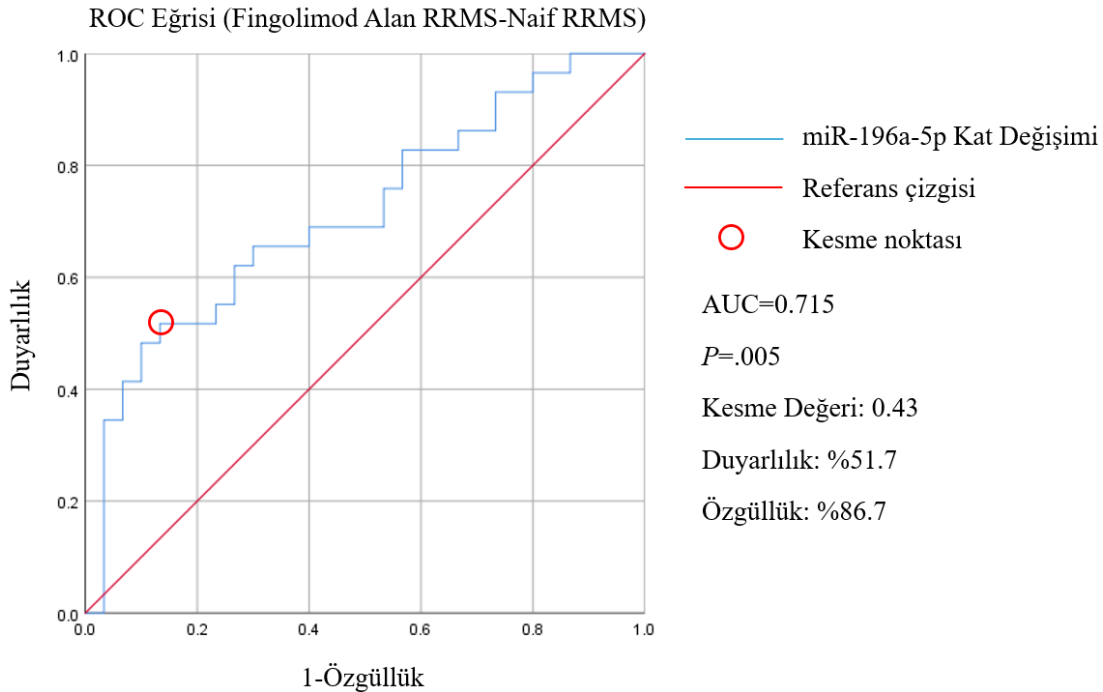
$$\text{Duyarlılık} = [DP/(DP+YN)] \times 100 = [26/(26+3)] \times 100 = \%89.7$$

$$\text{Özgüllük} = [DN/(DN+YP)] \times 100 = [24/(24+6)] \times 100 = \%80.0$$

$$\text{Doğruluk} = [(DP+DN)/(DP+DN+YP+YN)] \times 100 = [(26+24)/(26+24+6+3)] = \%84.8$$

miR-196a-5p'nin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS hastaları arasındaki ROC analizi

Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi için çizdirilen ROC eğrisi sonucunda plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin tedavi alan RRMS ve naif RRMS hastaları sınıflandırılması için orta derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.715, $P=.005$). Eğrinin koordinat değerleri kullanılarak duyarlılığın ve özgüllüğün toplamının maksimum değere sahip olduğu noktadaki Youden's Index değerine karşılık gelen miRNA rölatif ekspresyon seviyesi kesme değeri olarak belirlenmiştir. Buna göre plazma miR-196-5p rölatif ekspresyon seviyesi 0.43'ten düşük olanlar tedavi alan RRMS hastası, 0.43'e eşit ve 0.43'ten yüksek olanlar naif RRMS olarak sınıflandırılmıştır. Bu analizlerin sonucunda duyarlılık %51.7 ve özgüllük değeri %86.7 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10 Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve naif RRMS hastalarının (n=30) sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin eğrisi.

ROC analizlerinin anlamlı sonuç vermesinden dolayı plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Hata matrisi gerçekte ve kesme değerine göre sınıflandırılmış bireylerin sayılarından oluşmaktadır. Buna göre gerçekte ve kesme değerine göre fingolimod tedavisi alan RRMS hastası olan 15 kişi doğru pozitif (DP), gerçekte fingolimod tedavisi alan RRMS ancak kesme değerine göre naif RRMS hastası olan 14 kişi yanlış negatif (YN), gerçekte naif RRMS ancak kesme değerine göre fingolimod tedavisi alan RRMS hastası olan 4 kişi yanlış pozitif (YP) ve gerçekte ve kesme değerine göre naif RRMS hastası olan 26 kişi doğru negatif (DN) olarak ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre hata matrisinden duyarlılık %51.7, özgüllük %86.7 ve doğruluk %69.5 olarak hesaplanmıştır ( izelge 3.46).

Çizelge 3.46: Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasındaki hata matrisi.

		Gerçek Durum			
Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi <0.43 olduğunda fingolimod alan RRMS'tir		Fingolimod Alan RRMS	Naif RRMS	Toplam	
	Tahmin	Fingolimod Alan RRMS	15 (DP)	4 (YP)	19
		Naif RRMS	14 (YN)	26 (DN)	40
		Toplam	29	30	59

$$\text{Duyarlılık} = [DP/(DP+YN)] \times 100 = [15/(15+14)] \times 100 = \%51.7$$

$$\text{ zg ll k} = [DN/(DN+YP)] \times 100 = [26/(26+4)] \times 100 = \%86.7$$

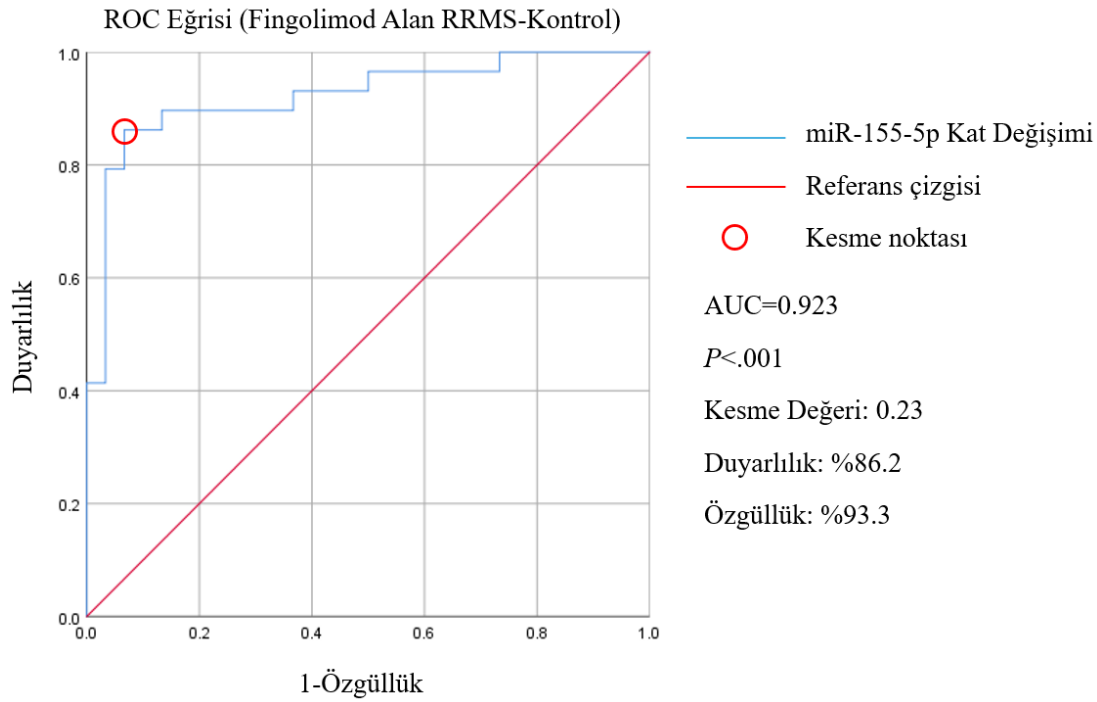
$$\text{Doğruluk} = [(DP+DN)/(DP+DN+YP+YN)] \times 100 = [(15+26)/(15+26+4+14)] = \%69.5$$

3.3.7.3 Fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında gerçekleştirilen analizler

Daha önce gerçekleştirilen analiz sonuçları göz önünde bulundurulduğunda bu tez kapsamında deneysel olarak çalışılan plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyelerinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarını sınıflandırma potansiyelleri değerlendirilmiştir. Plazma miR-146a-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri yönünden fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu için plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin ROC analizi eğrisi sonuçları alt başlıkta sunulmuştur.

miR-155-5p'nin fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasındaki ROC analizi

Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi için çizdirilen ROC e rtesi sonucunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için çok iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür ($AUC=0.923$, $P<.001$). E rtesinin koordinat değerleri kullanılarak duyarlılığın ve  zg ll   n toplamının maksimum değere sahip olduğu noktadaki Youden's Index değerine karşılık gelen plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyesi kesme değeri olarak belirlenmiştir. Buna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi 0.23'ten düşük olanlar tedavi alan RRMS hastası, 0.23'e eşit ve 0.23'ten yüksek olanlar naif RRMS olarak sınıflandırılmıştır. Bu analizlerin sonucunda duyarlılık %86.2 ve  zg ll  k değeri %93.3 olarak belirlenmiştir ( ekil 3.11).



Şekil 3.11: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi kullanılarak Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının sınıflandırılması için yapılan ROC analizinin e rtesi.

ROC analizlerinin anlamlı sonuç vermesinden dolayı plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin hata matrisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Hata matrisi gerçekte ve kesme değerine göre sınıflandırılmış bireylerin sayılarından oluşmaktadır.

Buna göre gerçekte ve kesme değerine göre fingolimod tedavisi alan RRMS hastası olan 25 kişi doğru pozitif (DP), gerçekte fingolimod tedavisi alan RRMS ancak kesme değerine göre kontrol olan 4 kişi yanlış negatif (YN), gerçekte kontrol ancak kesme değerine göre fingolimod tedavisi alan RRMS hastası olan 2 kişi yanlış pozitif (YP) ve gerçekte ve kesme değerine göre kontrol olan 28 kişi doğru negatif (DN) olarak ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaya göre hata matrisinden duyarlılık %86.2, özgüllük %93.3 ve doğruluk %89.8 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3.47).

Çizelge 3.47: Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS grupları arasındaki hata matrisi.

		Gerçek Durum			
Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi <0.23 olduğunda fingolimod alan RRMS'tir		Fingolimod Alan RRMS	Kontrol	Toplam	
	Tahmin	Fingolimod Alan RRMS	25 (DP)	2 (YP)	27
		Kontrol	4 (YN)	28 (DN)	32
		Toplam	29	30	59

$$\text{Duyarlılık} = [DP/(DP+YN)] \times 100 = [25/(25+4)] \times 100 = \%86.2$$

$$\text{Özgüllük} = [DN/(DN+YP)] \times 100 = [28/(28+2)] \times 100 = \%93.3$$

$$\text{Doğruluk} = [(DP+DN)/(DP+DN+YP+YN)] \times 100 = [(25+28)/(25+28+4+2)] = \%89.8$$

Grup-2'yi oluşturan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının ROC analizleri hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılarak gerçekleştirilmiştir (Naif RRMS-Kontrol, Fingolimod alan RRMS-Naif ve Fingolimod alan RRMS-Kontrol). Daha önce gerçekleştirilen ikili lojistik regresyon analizlerinde risk durumuyla ilişkili çıkan, gruplar arasında karşılaştırma analizlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde farklı olan ve bu tez kapsamında özgün olarak çalışılan deneysel parametrelerin iki grubu ayırma becerisi ROC analizleri ile değerlendirilmiştir. İkili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı çıkan parametrelerin ROC analizi eğrileri ve hata matrisi hesaplamaları detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Gerçekleştirilen analizler sonucunda ilişkili çıkan parametrelerin ROC analizi ve hata matrisi hesaplamaları sonuçları toplu bir şekilde Çizelge 3.48'de sunulmuştur.

Çizelge 3.48: Grup-2'deki naif RRMS (n=30), fíngolimod tedavisi alan RRMS (n=29) ve kontrol (n=30) gruplarının ikili olarak karşılaştırıldıklarında grupların sınıflandırılmaları ile ilişkili parametrelerin belirlenmesi için yapılan ROC analizlerinden istatistiksel olarak anlamlı bulunanlar.

Parametreler	ROC analizi sonucu				Duyarlılık (Sensitivity)		Özgüllük (Specificity)		Doğruluk (Accuracy)
	AUC	%95 CI	P	Kesme değeri	ROC	Hata matrisi	ROC	Hata matrisi	Hata matrisi
miR-155-5p Kat Değişimi (Naif RRMS-Kontrol)	0.691 (Zayıf)	0.56-0.83	.01	0.72	%80.0	%80.0	%63.3	%63.3	%71.7
miR-155-5p Kat Değişimi (Fingolimod Alan RRMS-Naif RRMS)	0.890 (İyi)	0.80-0.98	<.001	0.29	%89.7	%89.7	%80.0	%80.0	%84.8
miR-196a-5p Kat Değişimi (Fingolimod Alan RRMS-Naif RRMS)	0.715 (Orta)	0.58-0.85	.005	0.43	%51.7	%51.7	%86.7	%86.7	%69.5
miR-155-5p Kat Değişimi (Fingolimod Alan RRMS-Kontrol)	0.923 (Çok iyi)	0.85-1.00	<.001	0.23	%86.2	%86.2	%93.3	%93.3	%89.8
ROC: Receiver Operation Characteristics. AUC: Area Under the Curve									

4. TARTIŞMA

Genç yetişkinlerde travma harici nörolojik engelliliğin en yaygın sebebi olan MS nöroenflamatuvar, otoimmün ve demiyelinizan bir MSS hastalığıdır (Dobson & Giovannoni, 2019). Genç erişkinlerde hastaların yaşam kalitesini olumsuz şekilde etkileyen ve ölümcül olmayan bu hastalık, bireylerin iş yapabilme kapasitesini ciddi derecede etkilemektedir (Filippi vd., 2018). Hastalığın genetik ve çevresel birçok risk faktörü bulunmakla birlikte farklı klinik alt tipleri karakterize edilmiştir. MS hastalığını tamamen iyileştiren kesin bir tedavi yöntemi belirlenememiştir. MS’te kullanılan mevcut tedavi yöntemleri hastalığın seyrini yavaşlatmayı ve semptomlarını azaltmayı hedeflemektedir. MS hastalığının teşhisi, takibi ve fiziksel engelliliğin değerlendirilebilmesi için birkaç farklı klinik metot bulunuyor olsa da hastaların yaşam kalitesinin artırılması ve uygun tedavi yöntemlerinin kişiye özel olarak daha isabetli biçimde belirlenebilmesi için uygun biyobelirteçlere duyulan ihtiyaç günümüzde hala devam etmektedir (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018).

DMT grubu bir ilaç olan ve MS tedavisinde ikinci basamakta kullanılan Fingolimod, S1P reseptörü modülatörü olarak görev alan, immün-baskılayıcı ve ağızdan alınan bir ajandır (Willis & Cohen, 2013). Fingolimod dolaşımda lenfositler üzerinde ifade edilen S1P reseptörlerine bağlanarak, lenfositlerin lenf düğümlerinden dolaşıma çıkışını önlemekte ve bağışıklık yanıtlarını baskılamaktadır. KBB’yi aşabilen Fingolimod, MSS içerisinde de S1P reseptörlerine bağlanarak birçok koruyucu ve onarıcı etki gösterebilmektedir (Brinkmann vd., 2010).

Yaklaşık 18-24 nükleotit uzunluğunda, kodlama yapmayan RNA sınıfında olan miRNA’lar, hedef mRNA’lar üzerinde bulunan çekirdek dizilere bağlanarak transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde görev almaktadır. Tek bir mRNA birden fazla miRNA tarafından hedeflenebildiği gibi tek bir miRNA’nın da birden fazla mRNA hedefi olabilmektedir. miRNA’lar hedef mRNA’nın yıkımı ve translasyonun baskılanması gibi çeşitli mekanizmalarla post-transkripsiyonel düzenlemelerde görev alabilmektedir (Pasquinelli, 2012). Bağışıklık sisteminin ve enflamatuvar yanıtların

oluşması da dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde görev alan miRNA'lar birçok hastalığın teşhisi ve seyri ile ilişkilendirilmiş olup kandan bakılabilen kolay, hızlı ve pratik biyobelirteç keşif çalışmalarında popüler bir yer tutmaktadır (He & Hannon, 2004).

Toplumda %1'den fazla görülen genotip farklılıkları genetik polimorfizmler olarak tanımlanmakta ve bu farklılığın tek bir nükleotitten kaynaklandığı durumlar SNP olarak nitelendirilmektedir (Nelson vd., 2004). SNP'ler miRNA genlerinde de bulunabilir ve miRNA'ların stabilitelerine ve olgun miRNA oluşturma süreçlerine etki ederek ekspresyon seviyelerinde değişikliklere yol açabilirler. Değişen miRNA ekspresyon seviyeleri görev aldıkları fizyolojik fonksiyonların farklı düzeylerde regülasyonu ile sonuçlanabilir. SNP'lerin varlığı yaşam biçimi, etnik köken ve coğrafi faktörlerle birleşerek birçok hastalıkla da ilişki göstermektedir (Iwai & Naraba, 2005). Farklı toplumlarda görülme sıklığı değişiklik gösteren SNP'lerin Türk toplumunda da hastalıklarla olan ilişkisinin incelenmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, enflamatuvar ve bağışıklık yanıtlarının oluşmasıyla ilişkili olan miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p miRNA'larının dolaşımdaki ekspresyon seviyeleriyle bu miRNA'ların genlerinde bulunan SNP'lerin (rs2910164, rs767649, rs11614913) MS hastalığı riski ile ilişkisini inceleyerek, SNP'lerin miRNA plazma ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisinin, SNP'lerin Türk toplumunda MS'e yatkınlıktaki rolünün ve miRNA plazma ekspresyon seviyelerinin MS hastalığında teşhis ve tedavinin etkilerinin gözlemlenebilmesi için biyobelirteç olma potansiyellerinin değerlendirilmesidir. Bu çalışmada ilk defa bu miRNA'ların dolaşımdaki ekspresyon seviyeleri ile SNP'ler ve engellilik skorları arasındaki ilişkiler ve tedavinin etkileri incelenmiştir. Ayrıca bu miRNA genlerinde bulunan SNP'lerin MS hastalığıyla olan ilişkisi de Türk toplumunda ilk kez çalışılmıştır. 400 RRMS ve 400 kontrol katılımcısından oluşan Grup-1'de *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin RRMS ve engellilik skorlarıyla; 30 naif (tedavi almayan) RRMS, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS ve 30 kontrol katılımcısının bulunduğu Grup-2'de plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin hastalık riskiyle ve tedaviyle arasındaki ilişki incelenmiştir. Ayrıca SNP'lerin ve plazma rölatif ekspresyon seviyelerinin hastaların klinik bilgileriyle ilişkisi de incelenmiştir.

4.1 Çalışma Gruplarının Demografik ve Klinik Profili

Bu tez çalışmasında önceki bölümlerde detaylı bir şekilde açıklandığı gibi genetik polimorfizm çalışmalarının gerçekleştirildiği 400 RRMS hastası ve 400 kontrolden oluşan Grup-1 ve Grup-1 içerisinde bulunan ve rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif (tedavi almayan) RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrolden oluşan ve ekspresyon seviyesi çalışmalarının gerçekleştirildiği Grup-2 olmak üzere iki örnek grubu oluşturulmuştur (Şekil 3.1). Çalışma gruplarının demografik ve klinik profilleri ayrı ayrı incelenmiştir.

4.1.1 Grup-1'in demografik ve klinik profili

400 RRMS hastası ve 400 kontrolden oluşan Grup-1'de tam kan örneklerinden genomik DNA izole edilmiş ve izole edilen DNA'lar ile genetik polimorfizm çalışmaları gerçekleştirilmiştir. RRMS ve kontrol grupları karşılaştırılmış, hasta grubunun klinik bilgileriyle genotipler arasındaki ilişki incelenmiştir.

4.1.1.1 Grup-1'in demografik profili

MS hastalığının klinikte en sık görülen alt tipi olan RRMS genellikle genç erişkinlerde (20-40 yaş arası) ortaya çıkmaktadır (Filippi vd., 2018). Grup-1 çalışma grubu içerisinde bulunan 400 RRMS hastasının yaş ortalaması 34.4 ± 9.8 olarak belirlenmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında Grup-1 çalışma grubunu oluşturan RRMS ve kontrol grupları arasında yaş bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($P=.13$). Bu sayede yaş faktörünün hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırma analizlerinden elde edilen sonuçlara olan etkisi ortadan kaldırılmıştır (Çizelge 3.1).

MS hastalığına, erkeklere göre kadınlarda daha sık rastlanmaktadır. Dünya genelinde MS hastalarının %69'unu kadın MS hastaları oluştururken ülkemizde bu oran %67 olarak bildirilmiştir (URL-12). Grup-1 çalışma grubu içerisinde bulunan 400 RRMS hastasının içerisindeki kadın RRMS oranı %66.2 olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında RRMS ve kontrol grupları arasında cinsiyet bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ($P=.07$). Bu sayede cinsiyet faktörünün hasta ve kontrol grupları arasında yapılan karşılaştırma analizlerinden elde edilen sonuçlara olan etkisi ortadan kaldırılmıştır (Çizelge 3.1).

4.1.1.2 Grup-1'deki RRMS hastalarının klinik profili

Grup-1'deki RRMS hastalarının klinik bilgileri cinsiyetler arasında karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, RRMS hastalarının hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri, tedavi süreleri, alınan tedavi türleri, serum 25-(OH) D₃, total kolesterol, trigliserit, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol düzeyleri ve sigara içme durumları cinsiyetler arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.3). Grup-1'de bulunan kadın ve erkek RRMS hastaları arasında hastalık süresi ($P=.86$), hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) ($P=.07$), tedavi süresi ($P=.89$), alınan tedavi türü ($P=.31$), serum 25-(OH) D₃ ($P=.72$) ve total kolesterol ($P=.57$) düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır.

Grup-1'de bulunan kadın ve erkek RRMS hastalarının EDSS skorları karşılaştırıldığında, EDSS skorlarının erkek RRMS hastalarında kadın RRMS hastalarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.01$). Erkeklerde kadınlara göre daha ağır geçen, daha ağır fonksiyonel kayıplara ve ciddi semptomlara yol açan RRMS klinik alt tipinde cinsiyetler arasındaki bu farklılık literatürdeki farklı çalışmalarda da gösterilmiştir (Magyari & Koch-Henriksen, 2022; Ribbons vd., 2015). Engelliliğin ciddiyetine göre EDSS skorları derecelendirilebilmektedir. EDSS skoru 3'e eşit veya 3'ten küçük olan hastalar hafif düzey engelliliğe, 3'ten büyük hastalar ise orta düzey engelliliğe sahip hastalar olarak değerlendirilmektedir (Piri Cinar & Guven Yorgun, 2018). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde Jerkovic ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, çalışma popülasyonunda EDSS skoru 4 ile 8 arasında olan erkek MS hastalarının sayısının kadın MS hastalarının sayısından istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu bulunmuştur ($P=.01$) (Jerković vd., 2022). Bu tez çalışmasında da cinsiyetler arasında orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) karşılaştırıldığında erkek RRMS hastalarındaki $EDSS>3$ oranının kadın RRMS hastalarındakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.01$). Bu durum Grup-1'deki RRMS grubu içerisinde bulunan erkek RRMS hastalarının EDSS skorlarının kadın hastalara göre daha yüksek olmasıyla açıklanabilir.

RRMS hastalarında hastalık süresi ve EDSS skorları kullanılarak hastalığın progresyon hızını belirlemek için MSSS değerleri hesaplanmaktadır (Roxburgh vd., 2005). MS hastalığında cinsiyet faktörü düşünüldüğünde erkek MS hastalarında

hastalığın seyrinin daha ağır geçtiği, hastalığın daha ağır fonksiyonel kayıplara ve ciddi semptomlara yol açtığı bilinmektedir (Ribbons vd., 2015). Ayrıca RRMS'li erkeklerde ataklardan sonra daha zayıf iyileşmelerin görülmesi, hastalığın seyri boyunca daha fazla sakatlık gelişimi görülmesi ve RRMS'ten SPMS'e geçiş oranlarının daha yüksek olması da hastalığın erkeklerde daha kötü bir prognoza sahip olduğunun göstergesidir (Coyle, 2021; Safi & Krieger, 2021). Bu tez çalışmasında cinsiyetler arasında MSSS değerleri karşılaştırıldığında erkek RRMS hastalarının MSSS değerlerinin kadın RRMS hastalarına göre istatistiksel anlamda daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.009$). RRMS grubundaki kadın ve erkek RRMS hastaları hastalık süreleri bakımından anlamlı bir fark göstermese de EDSS skorlarının erkek RRMS hastalarında kadınlara göre yüksek olması MSSS değerlerinin de erkek RRMS hastalarında kadınlara göre daha yüksek olmasının açıklayıcısı niteliğindedir. Ek olarak, bu tez çalışmasında elde edilen bu sonuçlar, İsrail popülasyonunda gerçekleştirilen bir çalışmada çalışma grubundaki erkeklerin MSSS değerlerinin kadınların MSSS değerlerinden daha yüksek olduğunun gösterilmesiyle de benzerlik göstermektedir ($P=.008$) (Karni vd., 2022).

KBB'nin yapısının enflamatuar sitokin ve kemokinler aracılığıyla bozulmasıyla normal şartlar altında MSS'ye giriş yapamayan moleküllerden olan LDL-kolesterolün bu şekilde KBB'yi aştıktan sonra MSS içerisinde oksidasyona uğrayarak proenflamatuar sitokinlerin salınımını artırıp enflamasyon aracılı nöronal hasara yol açtığı bilinmektedir (Lorincz vd., 2022). Bu mekanizma dolayısıyla yüksek LDL-kolesterol düzeyleri yüksek EDSS skorları ve hastalık aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir (Boshra vd., 2022). Benzer şekilde serum trigliserit ve VLDL-kolesterol düzeylerinin de yüksek EDSS skorları ve MSSS değerleri ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (Lorincz vd., 2022; Weinstock-Guttman vd., 2011). Grup-1'de bulunan RRMS hastalarında trigliserit ($P<.001$), LDL-kolesterol ($P=.01$) ve VLDL-kolesterol ($P<.001$) bakımından cinsiyetler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır ve bu lipit parametreleri erkek RRMS hastalarında kadın RRMS hastalarına göre daha yüksektir. Yüksek EDSS skorları ile ilişkilendirilmiş olan bu serum lipit parametrelerinin, kadın RRMS hastalarına göre erkek RRMS hastalarında daha yüksek düzeyde olması çalışma grubunu oluşturan erkek RRMS hastalarının kadın RRMS hastalarına göre daha yüksek EDSS skorlarına sahip olmasıyla

açıklanabilir. Literatürdeki sonuçlar incelendiğinde de bu lipit parametrelerinin birçok farklı çalışmada daha yüksek EDSS skorlarıyla ve daha fazla MS'e bağlı engellilik ile ilişkilendirildiği görülmektedir (Ďurfinová vd., 2018; Gafson vd., 2018; Palavra vd., 2013; Zhornitsky vd., 2016). Serum trigliserit seviyelerinin MS'e bağlı engellilik arttıkça arttığı ve artan EDSS skorlarıyla pozitif bir korelasyona sahip olduğu gösterilirken (Ďurfinová vd., 2018; Zhornitsky vd., 2016) benzer şekilde serum LDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol düzeylerinin artan engellilik düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Gafson vd., 2018; Palavra vd., 2013). Bu tez çalışmasında da daha yüksek EDSS skorlarına sahip erkek RRMS hastalarında bu serum lipit parametrelerinin düzeylerinin daha düşük EDSS skorlarına sahip kadın RRMS hastalarından daha yüksek olması literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bir başka serum lipit parametresi olan HDL-kolesterol ise antioksidan enzimlerin dolaşıma salınımını arttırmakta ve adezyon moleküllerinin salınımını azaltarak antienflamatuvar etki göstermektedir. Bu mekanizma dolayısıyla HDL-kolesterol düşük EDSS skorları ve hastalık aktivitesiyle ilişkilendirilmiştir (Lorincz vd., 2022; Weinstock-Guttman vd., 2011). Farklı çalışmalarda düşük serum düzeyleri daha yüksek engellilik skorlarıyla ilişkilendirilen HDL-kolesterolün, hastalığın daha kötü bir prognoza sahip olduğu erkek MS hastalarında, kadın MS hastalarına göre daha düşük serum düzeylerinin olduğu da gösterilmiştir (Lorincz vd., 2022; Sancho-Rodríguez vd., 2011). Cinsiyetler arasında HDL-kolesterol ($P<.001$) düzeyinde de anlamlı fark görülmesi ve HDL-kolesterolün kadın RRMS hastalarında erkek RRMS hastalarına göre daha yüksek olması çalışma grubunu içerisinde bulunan kadın RRMS hastalarının erkek RRMS hastalarına göre daha düşük EDSS skorlarına sahip olmasıyla açıklanabilir ve literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

MS için başta gelen çevresel risk faktörleri arasında bulunan sigaranın MS geliştirme riskini yaklaşık 1.6 kat artırdığı gösterilmiştir (Handel vd., 2011). Sigaranın düzenli ve yüksek dozda kullanımı artan MS riskiyle beraber, MS'e bağlı engelliliğin ilerlemesiyle de ilişkilidir (Filippi vd., 2018). Literatürde sigara kullanan ve pasif içici olan MS hastalarının, sigara kullanmayan MS hastalarına göre daha yüksek EDSS skorlarına sahip olduğu gösterilmiştir (Manouchehrinia vd., 2013; Wu vd., 2023). Ek olarak Healy ve arkadaşları, sigara kullanan RRMS'li hastalarda RRMS'ten SPMS'e geçiş oranlarının sigara kullanmayan RRMS'li hastalara göre daha yüksek olduğunu

bildirmiştir (Healy vd., 2009). Bu çalışmada da cinsiyetler arası sigara kullanma durumu karşılaştırıldığında erkek RRMS hastalarında sigara kullanan birey sayısının kadın RRMS hastalarında sigara kullanan birey sayısına göre anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($P<.001$). Sigara kullanımının erkek RRMS hastalarında daha yüksek bir oranda bulunması, erkek RRMS hastalarının sahip olduğu yüksek EDSS skorlarının bu risk faktörü ile de açıklanabileceğini göstermektedir. Ek olarak kadın RRMS hastalarına göre daha yüksek EDSS skorlarına sahip erkek RRMS hastalarında sigara kullanımının daha yaygın olması literatürdeki sonuçlarla da uyumludur.

4.1.2 Grup-2'nin demografik ve klinik profili

Grup-1 içerisinde bulunan ve rastgele bir şekilde belirlenen 30 naif (tedavi almayan) RRMS hastası, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastası ve 30 kontrolden oluşan Grup-2'de plazma örneklerinden miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Elde edilen deneysel parametreler ile diğer klinik parametreler arasındaki ilişkiler hasta ve kontrol grupları arasında ve gruplar içerisinde incelenmiştir.

4.1.2.1 Grup-2'nin demografik profili

MS Atlas'ının güncel versiyonuna göre ülkemizde MS hastalığının başlangıç yaşı ortalaması 29 olarak bildirilmiştir (MSIF, 2020). Grup-2 çalışma grubu içerisinde bulunan 30 naif RRMS hastasının yaş ortalaması 30.8 ± 9.1 olarak belirlenmiş ve MS Atlas'ının güncel versiyonunda bildirilen MS hastalığı başlangıç yaşıyla benzer olduğu görülmüştür. Fingolimod tedavisinin ikinci basamak bir tedavi olmasından ve zamanla ilerleyen hastalık aktivitesi neticesinde bu tedaviye geçilmesinden kaynaklı olarak fingolimod tedavisi alan 29 RRMS hastasının yaş ortalaması (35.1 ± 8.4), kontrol grubunun yaş ortalamasından (26.8 ± 5.8) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir ($P<.001$) (Çizelge 3.2).

30 naif RRMS hastasının bulunduğu grupta kadın hasta oranı %63.3, 29 fingolimod tedavisi alan RRMS hastasının bulunduğu grupta kadın hasta oranı %72.4 ve kontrollerin bulunduğu grupta kadın oranı %66.7 olmakla birlikte Grup-2 çalışma grubu içerisinde bulunan naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında cinsiyet bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($P=.75$). Bu sayede cinsiyet faktörünün hasta ve kontrol grupları

arasında yapılan karşılaştırma analizlerinden elde edilen sonuçlara olan etkisi ortadan kaldırılmıştır (Çizelge 3.2).

4.1.2.2 Grup-2'nin klinik profili

Grup-2'deki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının klinik bilgileri gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, serum total kolesterol, trigliserit, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol düzeyleri ve sigara içme durumu her üç grup arasında karşılaştırılırken; serum 25-(OH) D₃ düzeyleri, hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri, T1 ve T2 lezyon sayıları ve kontrast tutan lezyon varlığı durumu hasta grupları arasında karşılaştırılmıştır (Çizelge 3.21).

Hasta ve kontrol grupları arasında serum total kolesterol ($P=.71$), LDL-kolesterol ($P=.72$), HDL-kolesterol ($P=.54$) ve VLDL-kolesterol ($P=.05$) düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Daha önce fingolimod tedavisine başlayan 72 MS hastasının 12 ay düzenli takibinden sonra lipit profili değişiklikleri incelenmiş, LDL-kolesterol ve trigliserit seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Rauma vd., 2020). MS'li kadın hastaların, MS olmayan kadınlara göre daha yüksek trigliserit düzeylerine sahip olduğunun (Lima vd., 2019) ve HDL-kolesterol dışındaki lipit parametrelerindeki artışın hastalığın seyrini olumsuz yönde etkilediğinin gösterilmesi (Tettey vd., 2017); kolesterol ve trigliserit değişimlerinin MS için doğrudan bir risk faktörü olmadığını fakat hastalığın progresyonuyla ve engellilik skorlarıyla ilişkili olabileceğini göstermiştir (Weinstock-Guttman vd., 2011). Bu tez çalışmasında diğer serum lipit parametrelerinden farklı olarak serum trigliserit düzeyinin fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.009$). Bu durum serum trigliserit düzeylerinin hastalık aktivitesiyle ve yüksek engellilik skorlarıyla ilişkilendirilmiş olmasıyla açıklanabilmektedir (Lorincz vd., 2022). MS için başta gelen çevresel risk faktörleri arasında bulunan sigaranın kontroller arasında kullanımının daha yaygın olduğu görülmektedir.

Hasta grupları arasında ise MSSS değerleri ($P=.26$), orta düzey EDSS ($EDSS>3$) riski ($P>.99$) ve hızlı MS progresyon ($MSSS>5$) riski ($P>.99$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuyorken, fingolimod alan RRMS hastalarının EDSS skorları, naif RRMS hastalarının EDSS skorlarına göre istatistiksel olarak anlamlı

derecede daha yüksektir ($P=.001$). Benzer şekilde fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarının hastalık süresi de naif RRMS grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($P<.001$). Literatürdeki sonuçlar incelendiğinde de herhangi bir DMT grubu ilaç kullanan MS hastalarının EDSS skorlarının ve hastalık sürelerinin henüz tedavi almayan MS hastalarına göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Fernández vd., 2020). Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olarak Can Demirdöğen ve arkadaşlarının çalışmasında da naif RRMS hastalarının hastalık sürelerinin ve EDSS skorlarının, fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmektedir (Can Demirdöğen vd., 2023). Benzer şekilde bir başka çalışmada da fingolimod tedavisi alan MS hastalarının daha uzun hastalık süresine ve yüksek EDSS skorlarına sahip olduğu bildirilmiştir (Rotstein vd., 2015). Fingolimod tedavisinin ikinci basamak bir tedavi olmasından ve zamanla ilerleyen hastalık aktivitesi neticesinde bu tedaviye geçilmesinden dolayı tedavi alan RRMS grubunun engellilik düzeylerinin ve hastalıkla birlikte geçirdikleri yılların naif RRMS hastalarından yüksek olması hastalığın doğası gereği görülen bir sonuçtur.

MS hastalığı için yetersizliğinin risk faktörü olduğu bilinen D vitamininin düzeyleri Grup-2 çalışma grubundaki naif RRMS hastalarında, fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarına göre anlamlı derecede yüksektir ($P=.002$). Daha yüksek hastalık aktivitesine ve EDSS skorlarına sahip hasta literatürde birçok gruplarının daha düşük D vitamini düzeylerine sahip olmasının örneği bulunmaktadır (Ferre vd., 2018; Smolders vd., 2008; Thouvenot vd., 2015). Örneğin, fingolimod tedavisi alan MS hastalarının %80'den fazlasının serum 25-(OH) D₃ düzeylerinin yetersiz seviyede (<49.9 nmol/L) olduğu görülmektedir (Ferre vd., 2018). Thouvenot ve arkadaşları RRMS grubunda serum D vitamini düzeylerinin EDSS skorlarıyla negatif korelasyon gösterdiğini bildirirken (Thouvenot vd., 2015), başka bir çalışmada ise düşük D vitamini düzeyleri MS hastalarında artan engellilik dereceleriyle ilişkilendirilmiştir (Smolders vd., 2008). Grup-2 çalışma popülasyonu içerisinde bulunan fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında MS'e bağlı olarak görülen hafıza kaybından dolayı, bu hastaların düzenli olarak D vitamini takviyelerini almamaları da naif RRMS hastalarından daha düşük D vitamini düzeylerine sahip olmalarının sebebi olabilir.

Hasta grupları arasında MRG parametreleri de karşılaştırılmış, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun hem T1 hem de T2 lezyon sayılarının naif RRMS grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür (T1 Lezyon sayısı: $P<.001$, T2 Lezyon sayısı: $P<.001$). Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, tedavi alınan iki yılın sonunda fingolimod tedavisi alan hastaların T1 ve T2 lezyon sayılarının tedavi almayan hasta grubuna göre daha düşük olduğu ve tedavinin uygulandığı iki yıl içerisinde T2 lezyon yükünde azalmalar olduğu bilinse de takip eden ileriki yıllarda hastalarda lezyon sayılarında artışlar olduğu bildirilmiştir (Dorfuss vd., 2015; Paolillo vd., 2002). Bu durum uygulanan tedavinin mekanizmasından ve etkinliğinden bağımsız olarak MS hastalığının ilerleyici doğasıyla ilişkilidir. Son olarak, bu çalışmada kontrast tutan lezyon varlığı bakımından da gruplar arasında anlamlı fark görülmüş, kontrast tutan lezyona sahip birey sayısının naif RRMS grubunda (%70.0) fingolimod tedavisi alan RRMS grubundan (%13.8) istatistiksel olarak fazla olduğu belirlenmiştir ($P<.001$). Henüz tedavi almamış olan naif RRMS grubunda hastalığın daha aktif olması daha fazla kontrast tutan lezyon varlığının açıklayıcısıdır. Ayrıca literatürdeki sonuçlara bakıldığında da kontrast tutan lezyonu olan bireylerin naif RRMS hasta grubunda (%50), tedavi alan RRMS hasta grubuna (%31.8) göre daha fazla sayıda bulunduğu görülmüştür (Ashida vd., 2022; Graziano vd., 2015). Literatürdeki bu sonuçlar, tez çalışmasından elde edilen sonuçlar ile uyumludur.

4.2 miRNA SNP Genotipleri ile RRMS Arasındaki İlişkiler

Multifaktöriyel bir doğası olan MS çevresel birçok faktörün genetik faktörlerle etkileşiminden ortaya çıkan kompleks bir etiyolojiye sahip otoimmün bir hastalıktır (Filippi vd., 2018). Hastalığın doğasının daha iyi anlaşılması için genetik risk faktörlerinin belirlenmesi önem taşımaktadır. MS ile en çok ilişkilendirilen ve 6. kromozomda bulunan *HLA* lokusunda görülen alel farklılıklarının MS'e yatkınlığın %20-30'unu oluşturduğu düşünülmektedir (Ghasemi vd., 2016). Genel olarak *HLA* sınıf II varyantları MS riskiyle ve *HLA-DRB1* lokusunda bulunan varyantların da daha genç tanı yaşıyla ilişkilendirildiği görülmüştür (Hensiek, 2002; Wu vd., 2010).

HLA lokusunda bulunan genetik varyantların MS ile ilişkili bulunmasının yanı sıra hastalığın patogenezinde rolü olan diğer faktörlerin de gen bölgelerinde bulunan

genetik varyantlar MS hastalığı riski ile ilişkilendirilmiştir (Zhang vd., 2005). 66 farklı gende bulunan 123 farklı SNP'nin genotiplerinin belirlendiği bir çalışmada 12. kromozom üzerinde bulunan ve aktifleşmiş T hücre inhibisyonundan görevli *LAG3* geninde bulunan rs19922452, rs951818 ve rs870849 SNP'lerinin MS hastalarında kontrol grubuna göre daha yaygın olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada T ve B hücre olgunlaşmasında görevli *IL7R* geninin hem intron (rs987106 ve rs987107) hem de ekzon (rs3194051) bölgesinde bulunan 3 farklı SNP MS hastalık riskiyle ilişkili bulunmuş, hasta grubunda homozigot polimorfik genotipe sahip birey sayısının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Zhang vd., 2005). 2019 yılında Uluslararası Multipl Skleroz Genetik Konsorsiyumu (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium – IMSGC) tarafından MS hastalığının genetik atlasının çıkarılması için genom çapında gerçekleştirilen çalışmada *HLA* lokusunda bulunan 32, X kromozomu üzerinde bulunan 1 ve otozomal kromozomlarda bulunan 200 SNP'nin bulunması da MS hastalığıyla birçok genetik varyasyonun ilişkili olabileceğini göstermiştir (Patsopoulos vd., 2019).

4.2.1 *MIR146A* rs2910164 G/C

MIR146A rs2910164 SNP'si *MIR146A* geninde 5:160485411 konumunda bulunan intronik bir tek nükleotit varyanttır. Bu SNP'nin minör aleli olan C alelinin global minör alel frekansı (gMAF) 0.245 iken majör alel olan G alelinin global alel frekansı 0.755'tir. Alel frekansı farklı toplumlarda ve kıtalarda değişiklik göstermektedir. Bu toplumlarda C alelinin en düşük MAF değeri Avrupa popülasyonunda (0.230) görülürken en yüksek MAF değeri de Doğu Asya popülasyonunda (0.616) görülmektedir. Minör alelin görülme sıklığı Amerikalı ve Afrikalı popülasyonlarda benzerlik taşısa da Latin Amerika popülasyonunda (0.312) Afrika popülasyonuna (0.367) göre daha düşük olduğu görülmektedir (URL-6).

MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin birçok otoimmün enflamatuar ve nörodejeneratif hastalıkla ilişkisi çalışılmıştır (Çizelge 4.1). MS gibi nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığında minör alel C alelinin TLR2'nin fonksiyonunu ve üretimini bozarak hastalığa genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Zhang vd., 2015). Yine Alzheimer hastalarının oluşturduğu bir popülasyonda C aleli taşıyıcılarının, yüksekliğinin Alzheimer riskiyle ilişkilendirildiği plazma A β _{42/40} (amyloid beta – A β)

oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Vogrinc vd., 2023). Otoimmün enflamatuar bir çocukluk romatizması hastalığı olan juvenil romatoid artrit hastalığı ile ilişkisinin incelendiği çalışmalarda, Hint popülasyonunda CC genotipi hastalığa yakınlıkla ilişkilendirilmişken (Singh vd., 2014); Meksika popülasyonunda rs2910164 G/C SNP'si ile hastalık arasında bir ilişki bulunmamıştır (Jiménez-Morales vd., 2012). Otoimmün enflamatuar hastalıklar olan SLE, RA, Behçet ve psoriatik artrit (PA) hastalıklarıyla da rs2910164 G/C SNP'sinin ilişkisi çalışılmıştır (Ahmadi vd., 2020; Alemán-Ávila vd., 2017; Chatzikyriakidou vd., 2010; Jiménez-Morales vd., 2012; Labib vd., 2019; Löfgren vd., 2012; Maharaj vd., 2018; Yang vd., 2011; Zhang vd., 2011; Zhou vd., 2014). Meksikalı, Avrupalı, Çinli ve İranlı SLE hastalarında rs2910164 G/C SNP'si hastalıkla ilişkili bulunmamışken (Ahmadi vd., 2020; Jiménez-Morales vd., 2012; Löfgren vd., 2012; Zhang vd., 2011); İranlı SLE hastalarıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada G aleli hastalığa yakınlıkla ilişkilendirilmiştir (Labib vd., 2019). Meksikalı SLE hastalarıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada minör C alelinin frekansının hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olduğu, C aleli frekansının kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Alemán-Ávila vd., 2017). Aynı çalışmada SNP alelleri ve genotipler bakımından RA hastaları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Alemán-Ávila vd., 2017). Benzer şekilde Çin ve Yunan popülasyonlarında gerçekleştirilen çalışmalarda da bu SNP'nin genotip ve alel frekansları bakımından RA hastaları ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemişken (Chatzikyriakidou vd., 2010; Yang vd., 2011); İranlı kadınlarda rs2910164 SNP'sinin GG genotipinin RA hastalık riski için koruyucu bir faktör olduğu görülmüştür (Ahmadi vd., 2020). Çin popülasyonunda gerçekleştirilen bir çalışmada ise CC genotipinin Behçet hastalığı için koruyucu bir faktör olduğu gösterilmiştir (Zhou vd., 2014). Hintli ve Kafkasyalı PA ve kontrollerden oluşan bir popülasyonda, Hintli hasta grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüş, minör alel C alelinin görülme frekansının PA hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur (Maharaj vd., 2018).

MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin MS ile ilişkisi de daha önce farklı toplumlarda çalışılmış, İtalyan popülasyonunda MS ile ilişkili bulunmamıştır (Fenoglio vd., 2011).

İran popülasyonunda G aleli (Labib vd., 2019); Çin ve Irak popülasyonlarında C aleli MS için bir risk faktörü olarak belirlenmiştir (Li vd., 2015; Shareef vd., 2021). Zamani ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ise İran popülasyonunda GC genotipi lojistik regresyon analizlerinde hastalık riskiyle ilişkili bulunmuştur (Zamani vd., 2024). Polimorfik C alelinin bu genin ürünü olan olgun miR-146a-5p ekspresyon seviyesini azalttığı (Jazdzewski vd., 2008) ve bu miRNA tarafından düzenlenen sitokinler aracılığıyla MS hastalığının patogeneze katkıda bulunduğu vurgulanmıştır (Shareef vd., 2021). *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin bu genin ürünü olan miR-146a-5p'nin ekspresyon seviyesi ile ilişkisi ve bu miRNA'nın hedeflediği genler aracılığıyla düzenlediği biyolojik süreçler bölüm 4.5.1.1'de detaylarıyla anlatılmıştır.

Çizelge 4.1: Farklı hastalıklarda ve popülasyonlarda rs2910164 G/C SNP'sinin C alel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımı.

Hastalık	Popülasyon	C Alel Frekansı		P	Referans
		Hasta	Kontrol		
Alzheimer	Çin	0.320	0.240	.03	Zhang vd., 2015
Alzheimer	Slovak	0.250	0.218	.52	Vogrinc vd., 2023
JRA	Hint	0.313	0.271	.21	Singh vd., 2014
JRA	Meksika	0.330	0.340	.61	Jimenez-Morales vd., 2012
SLE	Meksika	0.320	0.340	.55	
SLE	Avrupalı	0.248	0.240	.54	Löfgren vd., 2012
SLE	Çin	0.610	0.640	.99	Zhang vd., 2011
SLE	Meksika	0.308	0.323	.049	Alemán-Ávila vd., 2017
RA	Meksika	0.351	0.323	.21	
SLE	İran	0.260	0.317	.26	Ahmadi vd., 2020
RA	İran	0.354	0.317	.36	
RA	Çin	0.637	0.633	.91	Yang vd., 2011
RA	Yunan	0.268	0.276	.93	Chatzikiyriakidou vd., 2010
Behçet	Çin	0.566	0.635	<.001	Zhou vd., 2014
PA	Hint	0.357	0.226	.02	Maharaj vd. 2018
PA	Beyaz Irk	0.350	0.316	.60	
SLE	İran	0.350	0.550	<.001	Labib vd., 2019
MS	İran	0.303	0.550	<.001	
MS	İtalya	0.280	0.250	.27	Fenoglio vd., 2011
MS	Çin	0.587	0.564	.02	Li vd., 2015
MS	Irak	0.363	0.155	<.001	Shareef vd., 2021
MS	İran	0.200	0.130	.10	Zamani vd., 2024
HCC	Türk	0.214	0.200	.62	Akkız vd., 2011
Oligospermi	Türk	0.252	0.272	.55	Tunçdemir vd., 2018
Behçet	Türk	0.170	0.330	<.001	Oner vd., 2015
Behçet	Türk	0.179	0.323	<.001	Güven vd., 2021
MS	Türk	0.267	0.234	.12	Bu çalışma

JRA: Juvenil Romatoid Artrit, SLE: Sistemik Lupus Eritematozus, RA: Romatoid Artrit, PA: Psoriatik Artrit, MS: Multipl Skleroz, HCC: Hepatoselüler Karsinom.

MIR146A rs2910164 G/C SNP'sinin alellerinin görülme sıklığı toplumlar arasında farklılık göstermektedir. SNP alelleri farklı toplumlarda birçok nörodejeneratif ve

otoimmün hastalıkla ilişkili bulunmuştur ancak bu SNP'nin Türk toplumunda MS ile ilişkisi daha önce hiç çalışılmamıştır. Bu tez çalışmasında rs2910164 G/C SNP'sinin minör aleli olan C alelinin frekansı RRMS grubunda 0.267, kontrol grubunda 0.234 olarak belirlenmiştir. Farklı popülasyonlarda Alzheimer, SLE, PA ve MS gibi otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili çıkan bu SNP'nin bu çalışmada RRMS ve kontrol grupları arasında farklı olmadığı görülmüştür ($P=.12$) (Çizelge 4.1). Yaşa ve cinsiyete göre düzenlenerek yeniden hesaplanan OR, CI ve P değerlerine göre de gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Analizler farklı genotip modelleri kurularak da gerçekleştirilmiş; kodominant, dominant, resesif, overdominant ve log-additive modellerde de RRMS ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.5 ve 3.6).

MIR146A rs2910164 G/C SNP'si Türk toplumunda MS hastalığında daha önce hiç çalışılmamış olsa da farklı hastalıklarda genetik risk faktörü olma durumu değerlendirilmiştir. Hepatosellüler karsinomu bulunan hastalarla gerçekleştirilen bir çalışmada hasta grubunda minör C alel frekansı 0.214, kontrol grubunda 0.200 olarak (Akkız, vd., 2011); oligospermi hastalarıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise hasta grubunda minör C alel frekansı 0.252, kontrol grubunda 0.272 olarak belirlenmiştir (Tunçdemir vd., 2018). Türk toplumunda MS gibi otoimmün enflamatuar bir hastalık olan Behçet hastalığıyla da rs2910164 G/C SNP'sinin ilişkisi incelenmiştir. Oner ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada hasta grubunda minör C alelinin frekansı 0.170, kontrol grubunda 0.330 olarak belirlenmiştir (Oner vd., 2015). Yine Türk toplumunda Behçet hastalarıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise C aleli frekansı hasta grubunda 0.179, kontrol grubunda 0.323 olarak belirlenmiştir (Yenmis vd., 2021b). Bu sonuçlara göre rs2910164 SNP'sinin minör C alelinin Türk popülasyonundaki alel frekansının 0.170-0.330 arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.1). Bu tez çalışmasında da minör C aleli frekansı RRMS grubunda 0.267, kontrol grubunda 0.234 olarak belirlenmiş ve literatürdeki diğer çalışmaların sınırları içerisinde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar bu SNP'nin minör aleli için belirlen global (0.245) ve Avrupa (0.230) popülasyonu MAF değerleriyle de benzerlik göstermektedir (URL-6).

4.2.2 *MIR155* rs767649 T/A

MIR155 rs767649 SNP'si *MIR155* geninin 21:25572410 konumunda promotör bölgesinde bulunan bir SNP'dir. Bu SNP'nin minör aleli olan A alelinin gMAF değeri 0.066 iken majör alel olan T alelinin global alel frekansı 0.934'tür. Minör ve majör alelin farklı toplumlarda ve kıtalarda alel frekansı değişiklik göstermektedir. Bu toplumlarda A alelinin en düşük MAF değeri Afrika popülasyonunda (0.026) görülürken en yüksek MAF değeri de Doğu Asya popülasyonunda (0.330) görülmektedir. Afrika Amerika kökenlilerde (0.054), Avrupalılarda (0.064) ve Latin Amerikalılarda (0.068) ise minör alelin MAF skoru global MAF değerine benzer düzeyde belirlenmiştir (URL-7).

MIR155 rs767649 T/A SNP'sinin kanser dahil birçok hastalıkla ilişkisi farklı toplumlarda çalışılmıştır (Dezfuli vd., 2020; Kim & Hong, 2023; Li vd., 2023; Li vd., 2020; Polina vd., 2019) (Çizelge 4.2) İran popülasyonunda akciğer kanseri olan hastalarla gerçekleştirilen bir çalışmada rs767649 SNP'sinin TA genotipi ve A aleli frekansı akciğer kanseri bulunan hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur (Dezfuli vd., 2020). Koreli hipertansiyon hastalarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, rs767649 ve hastalık riski arasında bir ilişki bulunmamıştır (Kim & Hong, 2023). Li ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada ise Çin popülasyonunda iskemik inme ile bu SNP arasında bir ilişki bulunmamıştır (Li vd., 2020). Yine Çin popülasyonunda diyabetik retinopati hastalığıyla ilişkisi incelenmiş, progresif ve progresif olmayan diyabetik retinopati hasta gruplarıyla, kontrol grubu arasında bu SNP'nin genotipleri ve alel frekansı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Li vd., 2023). Polina ve arkadaşlarının Brezilya popülasyonunda gerçekleştirdiği bir çalışmada ise Tip 2 diyabet ve kontrol grupları arasında rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve alel frekansları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olsa da A alelinin Tip 2 diyabet hastalarında diyabetik retinopati riskini iki kat arttırdığı bildirilmiştir (Polina vd., 2019b).

MIR155 rs767649 T/A SNP'si ile farklı otoimmün ve enflamatuar hastalıkların ilişkisi daha önce çalışılmıştır (Çizelge 4.2). Örneğin, otoimmün bir rahatsızlık olan Tip 1 diyabet hastalığıyla ilişkisine bakıldığı bir çalışmada Brezilya popülasyonunda minör alel A alelinin Tip 1 diyabet için koruyucu bir etkisinin olduğu raporlanmıştır

(Assmann vd., 2017). Mısır popülasyonunda enflamatuar bir hastalık olan RA hastalığıyla ilişkisinin incelendiği bir çalışmada ise, RA hastalarında kontrol grubuna göre TT genotipinin frekansının anlamlı derecede yüksek olduğu rapor edilmiş, majör T alelinin RA hastalığı için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (Shaker vd., 2019). Mısır popülasyonunda gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise rs767649 T/A SNP'sinin TA ve AA genotipinin hastalık riski için koruyucu bir faktör olduğu görülmüştür (Elghouneimy vd., 2023).

MS gibi otoimmün enflamatuar bir hastalık olan Behçet hastalığında da heterozigot genotipe sahip hastaların, hastalığın aktivite durumunun izlenmesi için kullanılan Behçet Hastalığı Güncel Aktivite İndekslerinin daha yüksek olduğu ve rs767649 T/A SNP'sinin Behçet hastalığı riskiyle ve hastalığın progresyonuyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Abdelaleem & Shaker, 2021). Otoimmün ve enflamatuar bir başka hastalık olan SLE hastalığıyla olan ilişkisinin incelendiği çalışmalara bakıldığında, Mısır popülasyonunda rs767649 T/A SNP'sinin TT genotipinin ve T alelinin özellikle kadın hastalarda SLE hastalığı riskini arttırdığı bildirilmiştir (Mohammed vd., 2021). Yine SLE hastalığıyla olan ilişkisinin Çin popülasyonunda incelendiği bir başka çalışmada ise minör A alelinin SLE hastalığı için koruyucu bir etkisinin olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2022).

Literatürde rs767649 T/A SNP'sinin tek başına ve farklı SNP'ler ile bir arada bulunduğu zaman MS'e genetik yatkınlıkla ilişkili olabileceği sunulmuştur (Ali vd., 2020; Ali & Mohammed, 2024; Golshani vd., 2018). Mısırlı MS hastalarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada rs767649 SNP'sinin TT genotipi ve T aleli özellikle kadınlarda MS riskini arttırdığı bildirilmiştir (Ali vd., 2020). Benzer bir şekilde Irak popülasyonunda da TT genotipi ve T aleli MS riskiyle ilişkilendirilse de (Ali & Mohammed, 2024); İran popülasyonunda MS hasta ve kontrol grupları arasında SNP genotip ve alel frekansları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Golshani vd., 2018). Bu SNP'nin T alelinin, *MIR155* genin ürünü olan, immün ve enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde görevli miR-155-5p'nin daha yüksek seviyede ekspresyonuna sebep olarak hastalığa yatkınlığı arttırdığı düşünülmektedir (Ali & Mohammed, 2024). *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin bu genin ürünü olan miR-155-5p'nin ekspresyon seviyesi ile ilişkisi ve bu miRNA'nın hedeflediği genler aracılığıyla düzenlediği biyolojik süreçler bölüm 4.5.1.2'de detaylarıyla anlatılmıştır.

Çizelge 4.2: Farklı hastalıklarda ve popülasyonlarda rs767649 T/A SNP'sinin A alel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımı.

Hastalık	Popülasyon	A Alel Frekansı		P	Referans
		Hasta	Kontrol		
Akciğer Kanseri	İran	0.121	0.176	.05	Dezfuli vd., 2020
Hipertansiyon	Kore	0.449	0.455	.54	Kim & Hong, 2023
İskemik Atak	Çin	0.674	0.652	.27	Li vd., 2019
PDR	Çin	0.339	0.359	.60	Li vd., 2023
NPDR	Çin	0.383	0.359	.30	
Tip 2 Diyabet	Brezilya	0.070	0.060	.46	Polina vd., 2019
Tip 1 Diyabet	Brezilya	0.450	0.730	.006	Assman vd., 2017
RA	Mısır	0.392	0.673	<.001	Shaker vd., 2019
RA	Mısır	0.320	0.129	<.001	Elghouneimy vd., 2023
Behçet	Mısır	0.380	0.450	.16	Abdelaleem & Shaker, 2021
SLE	Mısır	0.475	0.575	.04	Mohammed vd., 2021
SLE	Çin	0.279	0.336	.04	Wang vd., 2022
MS	Mısır	0.382	0.579	<.001	Ali vd., 2020
MS	Irak	0.300	0.626	<.001	Ali & Mohammed, 2024
MS	İran	0.100	0.100	.33	Golshani vd., 2018
MS	Türk	0.136	0.124	.42	Bu çalışma

PDR: Progresif Diyabetik Retinopati, NPDR: Non-progresif Diyabetik Retinopati, RA: Romatoid Artrit, SLE: Sistemik Lupus Eritematozus, MS: Multipl Skleroz.

Bu tez çalışmasında rs767649 T/A SNP'sinin minör aleli olan A alelinin frekansı RRMS grubunda 0.136, kontrol grubunda 0.124 olarak belirlenmiştir. Farklı popülasyonlarda tip 1 diyabet, SLE, RA ve MS gibi otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili çıkan SNP'nin genotip ve alel frekanslarının bu çalışmada RRMS ve kontrol grupları arasında farklı olmadığı görülmüştür (Ali vd., 2020; Ali & Mohammed, 2024; Assmann vd., 2017; Shaker vd., 2019; Mohammed vd., 2021; Wang vd., 2019) (Çizelge 4.2). Yaşa ve cinsiyete göre düzenlenerek yeniden hesaplanan OR, CI ve P değerlerine göre de gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Analizler farklı genotip modelleri kurularak da gerçekleştirilmiş; kodominant, dominant, resesif, overdominant ve log-additive modellerde de RRMS ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.8 ve 3.9). Bu tez çalışmasıyla ilk defa Türk popülasyonunda bu SNP incelenmiş ve MS hastalığında minör A alelinin frekansı belirlenmiştir. Daha önce Türk toplumunda MS de dahil olmak üzere başka hastalıklarla da ilişkisi çalışılmadığı için, bu tez çalışmasında elde edilen minör A alelinin frekans değerinin karşılaştırılabileceği örnek bir çalışma bulunmamaktadır.

4.2.3 *MIR196A2* rs11614913 C/T

MIR196A2 rs11614913 SNP'si *MIR196A2* genin 12:53991815 konumunda bulunan intronik bir tek nükleotit varyanttır. Bu SNP'nin minör aleli olan T alelinin gMAF değeri 0.377 iken majör alel olan C alelinin global alel frekansı 0.623'tür. Minör ve majör alelin farklı toplumlarda ve kıtalarda alel frekansı değişiklik göstermektedir. Bu toplumlarda T alelinin en düşük MAF değeri Afrika (0.173) ve Afrika Amerikalı (0.175) popülasyonlarda görülürken en yüksek MAF değeri de Asya (0.493) ve Doğu Asya (0.487) popülasyonlarında görülmektedir. Avrupalılarda (0.394) ve Latin Amerikalılarda (0.378) ise minör alelin MAF skoru global MAF değerine benzer düzeyde belirlenmiştir (URL-8).

rs11614913 C/T SNP'sinin birçok kalp hastalığı ve kanser türüyle ilişkisi çalışılmıştır (Çizelge 4.3). Çin popülasyonunda gerçekleştirilen çalışmalarda rs11614913 C/T SNP'sinin genotipleri ve alelleri ile koroner arter hastalığı arasında bir ilişki bulunmamıştır (Xiong vd., 2014; Zhi vd., 2012) ancak yine Çin popülasyonunda gerçekleştirilen bir çalışmada T aleli kardiyomiyopati riski ile ilişkilendirilmiştir (Zhou vd., 2010). Avrupa popülasyonunda SNP ile yumurtalık kanseri arasında bir ilişki bulunmamışken (Lukács vd., 2019), Pakistan popülasyonunda gerçekleştirilen bir çalışmada CT genotipine sahip kadınların CC genotipine sahip kadınlara göre daha yüksek meme kanseri riski altında olduğu bildirilmiştir (Ahmad & Shah, 2020). Hepatoselüler karsinom ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada Çin popülasyonunda T alelinin hastalık için koruyucu bir faktör olduğu (Zhang vd., 2013), bir başka çalışmada ise CC genotipinin erkek hastalarda hepatoselüler karsinom riski ile ilişkili olduğu görülmüştür (Qi vd., 2010). Toraih ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada ise rs11614913 C/T SNP'sinin T aleli bir böbrek kanseri türü olan renal hücreli karsinom riski ile ilişkili bulunmuştur (Toraih vd., 2016).

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'sinin otoimmün ve enflamatuvar birçok hastalıkla olan ilişkisi farklı toplumlarda çalışılmıştır (Alemán-Ávila vd., 2017; Huang vd., 2013; Qi vd., 2013; Toraih vd., 2016; Yenmis vd., 2021) (Çizelge 4.3). Literatüre bakıldığında, Çin popülasyonunda otoimmün bir hastalık olan vitiligo hastalarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada rs11614913 SNP'sinin CC genotipi hastalık riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Huang vd., 2013). Bu SNP'nin farklı toplumlarda görülme sıklığı değişiklik gösterdiği gibi hastalıklarla olan ilişkileri de farklılık

göstermektedir. Örneğin, Meksika popülasyonunda SLE hastalığı için bir risk faktörü olmadığı öne sürülürken, Mısır popülasyonunda farklı SNP'ler ile bir aradayken RA hastalığına genetik yatkınlık ile ilişkilendirilmiştir (Alemán-Ávila vd., 2017; Toraih vd., 2016). Ancak Pakistan popülasyonunda RA riski ile ilişkili bulunmamıştır (Ali vd., 2023). Benzer şekilde, Çin popülasyonunda yapılan bir çalışmada T aleli ve TT genotipi Behçet hastalığı ile ilişkili bulunurken, Türk toplumunda yapılan başka bir çalışmada bu SNP Behçet hastalığı ile ilişkilendirilmemiştir (Qi vd., 2013; Yenmiş vd., 2021). Polimorfik T alelinin *MIR196A2* genin ürünü olan miR-196a-5p ekspresyon seviyesinde değişikliğe sebep olup proenflamatuvar sitokinlerin üretimini düzenleyerek enflamatuvar hastalıkların patogeneziyle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Hoffman vd., 2009; Qi vd., 2013). *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin bu genin ürünü olan miR-196a-5p'nin rölatif ekspresyon seviyeleri ile ilişkisi ve miR-196a-5p'nin hedeflediği genler ve görev aldığı biyolojik süreçler bölüm 4.5.1.3'te detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

Çizelge 4.3: Farklı hastalıklarda ve popülasyonlarda rs11614913 C/T SNP'sinin T alel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarında dağılımı.

Hastalık	Popülasyon	T Alel Frekansı		P	Referans
		Hasta	Kontrol		
KDH	Çin	0.527	0.514	.67	Xiong vd., 2014
KDH	Çin	0.574	0.594	.10	Zhi vd., 2011
Kardiyomiyopati	Çin	0.672	0.348	<.001	Zhou vd., 2010
Yumurtalık Kanseri	Avrupa	0.327	0.407	.15	Lukacs vd., 2019
Meme Kanseri	Pakistan	0.320	0.233	.002	Ahmad vd., 2020
HCC	Çin	0.540	0.582	.02	Zhang vd., 2013
HCC	Çin	0.525	0.513	.49	Qi vd., 2010
RCC	Mısır	0.408	0.290	.02	Toraih vd., 2016
Vitiligo	Çin	0.544	0.526	.31	Huang vd., 2013
RA	Mısır	0.237	0.275	.37	Toraih vd., 2016
RA	Pakistan	0.423	0.435	.72	Ali vd., 2023
RA	Meksika	0.397	0.389	.73	Alemán-Ávila vd., 2017
SLE	Meksika	0.384	0.389	.83	
Behçet	Çin	0.611	0.520	<.001	Qi vd., 2013
Behçet	Çin	0.619	0.557	.001	
Behçet	Türk	0.370	0.377	.85	Yenmiş vd., 2020
MS	İran	0.390	0.370	.70	Golshani vd., 2018
HCC	Türk	0.351	0.451	.006	Akkız vd., 2011
Multipl Miyelom	Türk	0.378	0.395	.66	Kirik vd., 2020
Ankilozan Spondilit	Türk	0.474	0.392	.02	Pehlivan vd., 2020
PEG	Türk	0.387	0.392	.86	Can Demirdöğen vd., 2023
PEX	Türk	0.397	0.392	.86	
MS	Türk	0.424	0.366	.018	Bu çalışma

KDH: Koroner Damar Hastalığı, HCC: Hepatoselüler Karsinom, RCC: Renal Hücre Karsinomu, RA: Romatoid Artrit, SLE: Sistemik Lupus Eritematozus, MS: Multipl Skleroz, PEG: Psödoeksfolyatif Glokom, PEX: Psödoeksfolyatif Sendrom.

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'sinin MS ile olan ilişkisi farklı popülasyonlarında çalışılmış MS'e yatkınlık ve EDSS skorlarıyla ilişkili bulunmamıştır (Golshani vd., 2018; Kiselev vd., 2015). SNP'lerin hastalıklarla olan ilişkisi etnik kökenin, cinsiyetin ve coğrafi etmenlerin katkısıyla değişiklik gösterebilmektedir. Her ne kadar farklı toplumlarda çalışılmış olsa da bu SNP'nin MS hastalığıyla olan ilişkisi daha önce Türk toplumunda çalışılmamıştır. Bu tez çalışmasında rs11614913 C/T SNP'sinin minör aleli olan T alelinin frekansı RRMS grubunda 0.424, kontrol grubunda 0.336 olarak belirlenmiştir. T alelinin RRMS ile 1.27 kat ilişkili olduğu görülmüştür ($P=.018$). Ek olarak dominant modele göre de TT+CT genotipinin CC genotipine kıyasla RRMS ile 1.51 kat ilişkili olduğu belirlenmiştir ($P=.005$) (Çizelge 3.11). OR ve P değerleri yaşa ve cinsiyete göre düzenlenerek yeniden hesaplandığında dominant modele göre de TT+CT genotipinin RRMS riskiyle 1.51 kat ilişkili olduğu görülmektedir ($P=.005$) (Çizelge 3.12). Bu sonuçlara göre rs11614913 C/T SNP'sinin T aleli Türk toplumunda RRMS riskiyle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur ($P=.018$).

MIR196A2 rs11614913 C/T SNP'si Türk toplumunda MS hastalığında daha önce hiç çalışılmamış olsa da farklı hastalıklarda genetik risk faktörü olma durumu değerlendirilmiştir. Hepatosellüler karsinomu bulunan hastalarla gerçekleştirilen bir çalışmada hasta grubunda minör T alel frekansı 0.351, kontrol grubunda 0.451 olarak (Akkız vd., 2011); multipl miyelom hastalarıyla gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise hasta grubunda minör T alel frekansı 0.378, kontrol grubunda 0.395 olarak belirlenmiştir (Kirik vd., 2020). Ankilozan spondilit hastalarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise minör T alelinin frekansı hasta grubunda 0.474, kontrol grubunda 0.392 olarak belirlenmiştir (Pehlivan vd., 2020). Türk popülasyonunda yapılan bir diğer çalışmada ise minör T alelinin frekansı kontrol grubunda 0.392, psödoeksfoliyatif glokom (PEG) hasta grubunda 0.387 ve PEX hasta grubunda 0.397 olarak belirlenmiştir (Can Demirdöğen vd., 2023). Türk toplumunda MS gibi otoimmün enflamatuar bir hastalık olan Behçet hastalığıyla da rs11614913 C/T SNP'sinin ilişkisi incelenmiştir. Yenmiş ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada hasta grubunda minör T alelinin frekansı 0.370, kontrol grubunda 0.377 olarak belirlenmiştir (Yenmiş vd., 2021b). Bu sonuçlara göre rs11614913 SNP'sinin minör T alelinin Türk popülasyonundaki alel frekansının 0.351-0.474 arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.3). Bu tez çalışmasında da minör T aleli frekansı RRMS grubunda 0.424,

kontrol grubunda 0.366 olarak belirlenmiş ve literatürdeki diğer çalışmaların sınırları içerisinde olduğu görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlar bu SNP'nin minör aleli için belirlen global (0.377) ve Avrupa (0.394) popülasyonu MAF değerleriyle de benzerlik göstermektedir (URL-8).

4.2.4 miRNA SNP'lerinin kombinasyonları

Bu tez çalışmasında incelenen üç farklı miRNA SNP'si olan rs2910164 G/C, rs767649 T/A ve rs11614913 C/T SNP'lerinin ikili ve üçlü kombinasyonları ile gerçekleştirilen analizlerde GGTT ($P=.007$) ve GGCC ($P=.008$) ikili kombinasyonlarına sahip bireyler kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla; TACT ($P<.001$) ikili kombinasyonuna ve GTTACT ($P=.003$) üçlü kombinasyonuna sahip bireyler RRMS grubunda anlamlı derecede daha fazla olarak bulunmuştur (Çizelge 3.13). Bu sonuçlar farklı miRNA SNP varyantlarının bir aradayken hastalık riskiyle veya hastalığa karşı koruyucu bir rol ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Ayrıca bu miRNA SNP varyantlarının MS hastalık riski ile ilişkisi de ilk kez bu tez kapsamında çalışılmıştır.

4.3 miRNA SNP'leri ile RRMS Hastalarının Klinik Bulgularının Arasındaki İlişkilerin İncelenmesi

Grup-1 popülasyonunda bulunan 400 RRMS hastasının klinik bilgileri ile miRNA SNP'lerinin arasındaki ilişkiler analiz edilmiştir. Bu bağlamda 400 RRMS hastasının hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri, tedavi süreleri, alınan tedavi türleri, serum 25-(OH) D₃, total kolesterol, trigliserit, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol düzeyleri ve sigara içme durumları ile *MIR146A* rs2910164 G/C, *MIR155* rs767649 T/A ve *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'leri arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Bu analizlerde farklı genotip modelleri (kodominant, resesif ve dominant) kullanıldığından dolayı çoklu testler için düzeltme uygulanmış, anlamlılık sınırı kullanılan genotip modeli sayısına bölünmüş ve $.05/3=.0167$ olarak yeniden hesaplanmıştır.

4.3.1 *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin etkileri

Türk toplumunda MS hastalığıyla ilişkisi ilk defa çalışılan bu SNP'nin genotiplerine göre oluşturulan gruplar arasında klinik bulgular karşılaştırıldığında GG, GC ve CC genotipine sahip RRMS hastaları arasında hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS

değerleri ve tedavi süreleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.14). Zhou ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği boylamsal bir çalışmada ilk demiyelinizan ataktan sonra takibe alınana Mısırlı hastalarda GC veya CC genotipine sahip olmak kesin MS tanısı alma riskiyle ilişkilendirilse de takip eden yıllarda MS hastalarının EDSS skorlarının yıllık değişimi SNP genotipleri arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Zhou vd., 2018). Koroner damar hastalığında GG genotipine ve gebelik zehirlenmesi hastalığında GC veya CC genotipine sahip bireylerde serum total kolesterol, trigliserit ve LDL-kolesterol düzeylerinin yüksek; HDL-kolesterol düzeylerinin düşük olduğu gösterilmiş olsa da bu çalışmada rs2910164 SNP'sinin GG, GC ve CC genotipine sahip RRMS hastaları arasında serum lipit parametreleri düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Abo-Elmatty vd., 2019; Ali vd., 2023). MS için çevresel risk faktörlerinden olan sigara kullanımı ve serum 25-(OH) D₃ düzeyleriyle de SNP arasında anlamlı bir ilişkili bulunmamıştır (Çizelge 3.14).

4.3.2 *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin etkileri

Türk toplumunda MS hastalığıyla ilişkisi ilk defa bu tez çalışmasında incelenen rs767649 T/A SNP'sinin, farklı toplumlarda da MS ile ilişkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu yüzden bu tez çalışmasında SNP'nin genotiplerine göre oluşturulan grupların klinik bulgularının ve gruplar arası karşılaştırma sonuçlarının kıyaslanacağı örnek bir çalışma bulunmamaktadır. Bu SNP'nin genotiplerine göre oluşturulan gruplardaki klinik bulguların dağılımları karşılaştırıldığında hastalık süresi, EDSS skorları ve MSSS değerleri bakımından TT, TA ve AA genotipine sahip RRMS hastaları arasında anlamlı bir fark bulunmasa da dominant modelde TT genotipine sahip bireylerin TA veya AA genotipine sahip bireylere göre daha uzun süredir tedavi almakta olduğu görülmüştür ($P=.011$) (Çizelge 3.15). Hipertansiyon hastalarında gerçekleştirilen bir çalışmada rs767649 T/A SNP'si ile serum trigliserit ve HDL-kolesterol düzeyleri arasında bir ilişki görülmediği gibi bu çalışmada da TT, TA ve AA genotipine sahip MS hastaları arasında serum lipit parametreleri düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Kim & Hong, 2023). MS için çevresel risk faktörlerinden olan sigara kullanımı ve serum 25-(OH) D₃ düzeyleriyle de SNP arasında anlamlı bir ilişkili bulunmamıştır (Çizelge 3.15).

4.3.3 *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin etkileri

Bu tez çalışmasında incelenen diğer miRNA SNP'leri gibi rs11614913 C/T SNP'sinin de Türk toplumunda MS hastalığıyla ilişkisi ilk defa çalışılmıştır. Kiselev ve arkadaşlarının Rus popülasyonunda gerçekleştirdiği bir çalışmada *MIR499A* rs3746444 C/T SNP'sinin C aleli ile *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin C aleline birlikte sahip olan kadın hastaların daha yüksek MSSS değerlerine sahip olduğu görülse de (Kiselev vd., 2015) bu tez çalışmasında SNP'nin genotiplerine göre oluşturulan gruplar arasında klinik bulgular karşılaştırıldığında CC, CT ve TT genotipine sahip RRMS hastaları arasında hastalık süresi, EDSS skorları, MSSS değerleri ve tedavi süreleri bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 3.16). CC, CT ve TT genotipine sahip MS hastaları arasında serum lipit parametreleri düzeyleri karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. MS için çevresel risk faktörlerinden olan sigara kullanımı ve serum 25-(OH) D₃ düzeyleriyle de SNP arasında anlamlı bir ilişkili bulunmamıştır (Çizelge 3.16).

4.4 MS Riski, Engellilik Düzeyleri ve MS Progresyonu ile İlişkili Parametreler

Bu tez çalışmasında incelenen *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin genotiplerinin ve farklı genotip modellerinin MS hastalık riskiyle ilişkileri RRMS ve kontrol grupları arasında, bu genotiplerin ve farklı genotip modellerinin klinik parametrelerle bir aradayken orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ve hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkileri ise RRMS grubunda ikili lojistik regresyon analizleri ile incelenmiştir.

4.4.1 MS hastalık riski ile ilişkili parametreler

MS hastalık riski ile ilişkili parametrelerin analizinde SNP'ler kodominant, resesif ve dominant model olarak ayrı ayrı incelenmiştir. Bu ikili lojistik regresyon analizlerinde rs11614913 CT genotipi hastalık riskiyle 1.52 kat ilişkili bulunmuştur ($P=.008$) (Çizelge 3.18). Bu SNP'nin Türk toplumunda MS hastalığındaki rolüne dair örnek bir çalışma bulunamamakla birlikte İran popülasyonunda gerçekleştirilen bir çalışmada MS ile ilişkili bulunmamıştır (Golshani vd., 2018). *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'si pre-miR-196a2'nin 3' UTR bölgesinde bulunduğu için birincil ve öncül miRNA'ların olgun formuna işlenmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Polimorfik T alelinin

MIR196A2 genin ürünü olan miR-196a-5p ekspresyon seviyesinde değişikliğe sebep olup proenflamatuar sitokinlerin üretimini düzenleyerek enflamatuar hastalıkların patogeneziyle ilişkili olabileceği vurgulanmıştır (Hoffman vd., 2009; Qi vd., 2013). SNP'nin enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde rolü olduğu bilinen ve kendi ürünü olan miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri sebebiyle MS hastalığının patogeneziyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. T alelinin MS riskiyle ilişkisinin açıklanması ve altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılması için bu genin ürününün ve hedeflediği genlerin birlikte çalışıldığı daha kapsamlı fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

4.4.2 Engellilik düzeyleri ile ilişkili parametreler

Orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkili parametrelerin analizinde SNP'ler kodominant, resesif ve dominant model olarak ayrı ayrı incelenmiştir. Bu ikili lojistik regresyon analizlerinde kodominant, resesif ve dominant modellerde orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile hastalık süresinin 1.23 kat; tedavi süresinin de 1.24 kat ilişkili olduğu bulunmuştur (Hastalık süresi: $P<.001$, Tedavi süresi: $P<.001$) (Çizelge 3.19). EDSS skorları ve hastalık süresinin ilişkisi literatürde çeşitli çalışmalarda incelenmiştir (Alsaedi vd., 2022; Ligouri vd., 2000; Limmroth vd., 2007). Beş yıldan daha az süredir tanıli MS hastası olmak, daha düşük EDSS skorlarına sahip olmakla 2.94 kat ilişkili bulunurken, daha uzun hastalık süresine sahip RRMS hastalarının EDSS skorlarının, daha kısa hastalık süresine sahip hastalara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Alsaedi vd., 2022; Limmroth vd., 2007). Liguori ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir başka çalışmada da hastalık süresinin artmasıyla birlikte MS'e bağlı klinik engelliliğin ilerlediği gösterilmiştir (Ligouri vd., 2000). Bu tez çalışmasında da elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Yeni semptomların ortaya çıktığı veya mevcut semptomların kötüleştiği atak dönemlerinin genellikle birkaç gün ile birkaç hafta sürdüğü ve iyileşme dönemlerinde kısmi veya tama yakın düzelmelerin görüldüğü RRMS klinik alt tipinde hastalık süresinin ve buna bağlı olarak uzayan tedavi sürelerinin hastalarda biriken engellilik düzeyleriyle olan ilişkisi hastalığın ilerleyici doğasından kaynaklanmaktadır.

Orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkili olduğu belirlenen bir diğer parametre de VLDL-kolesteroldür. VLDL-kolesterol, hastalık süresiyle (OR=2.13, $P=.03$) ve tedavi

süresiyle ($OR=2.40$, $P=.01$) birlikteyken orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) ile ilişkili bulunmuştur (Çizelge 3.19). Literatürdeki sonuçlar incelendiğinde, bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara benzer olarak MS hastalarında yüksek serum VLDL-kolesterol düzeylerinin, daha yüksek EDSS skorlarıyla ilişkilendirildiği çalışmalar olduğu görülmektedir (Gafson vd., 2018; Pineda-Torra vd., 2021). Literatürdeki dikkat çekici bir diğer sonuç da serum VLDL-kolesterol düzeylerinin yüksek engellilik düzeyleri ile pozitif bir korelasyona sahip olduğunun gösterilmesidir (Lorincz vd., 2022; Weinstock-Guttman vd., 2011). Benzer şekilde bu tez çalışmasında, RRMS grubunda EDSS skorlarıyla serum lipit parametreleri arasında gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde de serum VLDL-kolesterol düzeylerinin EDSS skorları ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($\rho=.248$, $P<.001$) (Çizelge 3.17). Literatürdeki benzer sonuçlarla desteklenen bu tez çalışmasının sonuçlarına göre artan EDSS skorlarıyla korelasyon gösteren VLDL-kolesterol seviyesinin orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) ile ilişkili bulunması tutarlılık göstermektedir.

4.4.3 MS hastalık progresyonu ile ilişkili parametreler

Hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) ile ilişkili parametrelerin analizinde SNP'ler kodominant, resesif ve dominant model olarak ayrı ayrı incelenmiştir. Bu ikili lojistik regresyon analizlerinde VLDL-kolesterol kodominant ($OR=2.51$, $P=.002$) ve dominant ($OR=2.50$, $P=.002$) modellerde hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) ile ilişkili bulunmuştur (Çizelge 3.20). Literatürde VLDL-kolesterol düzeylerinin MS progresyonuyla ilişkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen, daha önce anlatıldığı üzere, VLDL-kolesterolün MS hastalarındaki yüksek serum düzeyleri MS'e bağlı olarak biriken ve ilerleyen engellilik durumu ile ilişkilendirilmiştir (Gafson vd., 2018; Pineda-Torra vd., 2021). Serum VLDL-kolesterol düzeylerinin yüksek MSSS değerleri ile pozitif bir korelasyona sahip olduğunun gösterilmesi de kolesterol değişimlerinin MS için doğrudan bir risk faktörü olmadığını fakat hastalığın progresyonuyla ve engelliliğin ilerlemesiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Lorincz vd., 2022; Weinstock-Guttman vd., 2011). Benzer şekilde bu tez çalışmasında, RRMS grubunda MSSS değerleriyle serum lipit parametreleri arasında gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde serum VLDL-kolesterol düzeylerinin MSSS değerleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($\rho=.185$, $P<.001$) (Çizelge

3.17). Literatürdeki sonuçlarla uyumlu olan bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, artan MSSS değerleriyle korelasyon gösteren VLDL-kolesterol seviyesinin hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunması tutarlılık göstermektedir.

Hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunan bir diğer parametre de trigliserittir. Serum trigliserit düzeyleri hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile 1.18 kat ilişkili bulunmuştur ($P=.04$) (Çizelge 3.20). Literatürdeki çalışmalarda da daha yüksek trigliserit seviyelerinin MS hastalarında daha yüksek MSSS değerleriyle ilişkilendirildiği görülmektedir (Sena vd., 2019; Tettey vd., 2014, 2017). Bazı çalışmalarda ise serum trigliserit düzeylerinin yüksek MSSS değerleri ile pozitif bir korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (Lorincz vd., 2022; Weinstock-Guttman vd., 2011). Benzer şekilde bu tez çalışmasında, RRMS grubunda MSSS değerleriyle serum lipit parametreleri arasında gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde de serum trigliserit düzeylerinin MSSS değerleri ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur ($\rho=.146$, $P=.004$) (Çizelge 3.17). Literatürdeki sonuçlarla benzerlik gösteren bu tez çalışmasının sonuçlarında da artan MSSS değerleriyle korelasyon gösteren trigliserit seviyesinin hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunması tutarlılık göstermektedir.

Hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili parametrelerin incelenmesi için gerçekleştirilen ikili regresyon analizlerinde rs2910164 SNP'sinin GC veya CC genotipine sahip olma durumu farklı modellerde hızlı MS progresyon riski ile ilişkili bulunmuştur (Model 5: OR=1.83, $P=.047$; Model 6: OR=1.19, $P=.049$) (Çizelge 3.20). Literatür sonuçları incelendiğinde *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin GC veya CC genotipinin proenflamatuar sitokinlerin salınımını etkileyerek kadınlarda MS progresyonuna katkıda bulunduğu gösterilmiştir. SNP'nin GC veya CC genotipine sahip bireylerde TNF- α , IL-1 β ve IFN- γ gibi proenflamatuar sitokinlerin ekspresyon seviyelerinin GG genotipine sahip RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olması, *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin GC ve CC genotipinin RRMS hastalarında daha güçlü enflamatuar yanıtlar oluşmasına ve hastalığın daha şiddetli bir progresyon göstermesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Li vd., 2015). Bu tez kapsamında çalışılan bu SNP'nin farklı genetik ve ikili lojistik regresyon modellerinde hızlı MS progresyonu riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunması, literatürde bulunan sonuçlarla desteklenmektedir.

4.5 miRNA Seviyelerinin RRMS ile İlişkileri

4.5.1 Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleriyle RRMS arasındaki ilişkiler

Tükürük, periton sıvısı, BOS, idrar, anne sütü, gözyaşı ve serum/plazma gibi birçok vücut sıvısında bulunabilen ve hücre dışı dolaşımında da oldukça kararlı kalabilen miRNA'lar, hedefledikleri genler, proteinler ve biyolojik sinyal yolları ile hücrel gelişim ve farklılaşma, metabolizma, göç ve apoptoz gibi birçok biyolojik sürece dâhil olabilmektedir (Kim vd., 2009). Bu kadar geniş bir yelpazede etki mekanizmasına sahip bu RNA ailesinin farklı hastalıklarda tanısal, prognostik ve terapötik biyobelirteç olma potansiyelleri çalışılmaktadır (Kacperska vd., 2016). Karmaşık bir etiyolojiye sahip MS hastalığının da tanı ve takibinde güvenilir, hızlı ve kolay erişilebilir biyobelirteçlere olan ihtiyaç devam etmektedir. Dolaşımdaki miRNA'ların MS ile ilişkilerinin araştırılmasının, MS'in patogenezinin anlaşılmasına, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve tedavi yanıtlarının pratik bir şekilde klinikte takip edilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir (Fenoglio vd., 2012). Hasta ve kontrol gruplarının serum/plazma numunelerinden gerçekleştirilen çalışmalarda RRMS ile ilişkili bulunmuş olan miRNA'lar Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Literatüre bakıldığında bugüne kadar dolaşımdaki birçok miRNA'nın MS ile ilişkisinin çalışıldığı görülmektedir. MSS'de biriken demiyelinizasyonu takiben gelişen nörodejenerasyonla karakterize olan MS hastalığında, tedavi almayan MS hastalarının serum miRNA ekspresyon seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, miR-145-5p'nin ekspresyon seviyesinin MS hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P<.001$) (Søndergaard vd., 2013). Yüksek seviyede ifade edilen miR-145-5p'nin Nurr1 (nuclear receptor related 1 protein – Nurr1) ekspresyonunu baskıladığı ve buna bağlı olarak TNF- α ile ilişkili nöron hasarına yol açtığı bilinmektedir (Xie vd., 2017). Bir başka çalışmada aksonal hasarla ilişkili olan miR-30b-5p ($P<.05$) ve miR-342-3p'nin ($P<.05$) plazma ekspresyon seviyelerinin hasta grubunda kontrol grubundan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Ebrahimkhani vd., 2017). Plazma miR-145-5p, miR-30b-5p ve miR-342-3p ekspresyon seviyelerinin MS hastalarında kontrollere göre daha yüksek seviyede olması, bu miRNA'ların hastalığın patogenezinin dolaylı yoldan etkilediğini göstermektedir.

Mancuso ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada nöron büyümesi, MSS'nin onarımı ve remiyelinizasyonda rol oynayan NCAM (neural cell adhesion molecule – NCAM) proteinini hedefleyen miR-572-5p'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyesinin RRMS hastalarında kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gösterilmiştir ($P=.003$) (Mancuso vd., 2015). Ek olarak RRMS hastalarının atak dönemlerinde serum miR-572-5p'nin ekspresyon seviyesinin artması da bu miRNA'nın hastalığın farklı dönemlerinde NCAM aracılı nöral rejenerasyonu düzenlediğini düşündürmektedir (Mancuso vd., 2015).

Çizelge 4.4 Serum/plazma numunelerinde RRMS ile ilişkili miRNA'lar.

Gruplar	Numune	miRNA	Sonuç	Referans
RRMS vs. Kontrol	Plazma	miR-145-5p	↑	Sondergraad vd., 2013
RRMS vs. Kontrol	Serum	miR-15b-5p, miR-30b-5p, miR-342-3p	↑	Ebrahimkhani vd., 2017
RRMS vs. Kontrol	Serum	miR-572-5p	↓	Mancuso vd., 2015
RRMS vs. Kontrol	Serum	miR-15, miR-23a, miR-233	↓	Fenoglio vd., 2013
RRMS vs. Kontrol	Plazma	miR-34a, miR-125a	↑	Guliani vd., 2021
		miR-146a	↓	
SPMS vs. RRMS	Serum	miR-128-5p	↑	Zanoni vd., 2020
RRMS vs. Kontrol	Plazma	miR-22-5p, miR-30e-5p, miR-140-3p, miR-210-5p, miR-500-5p, miR-574-3p	↑	Gandhi vd., 2013
SPMS vs. RRMS	Plazma	miR-92a-1, miR-135a-5p, miR-454-5p	↑	
RRMS vs. Kontrol	Serum	miR-23a-3p	↑	Al-Temaimi vd., 2024
		miR-326	↑	
SPMS vs. RRMS	Serum	miR-150-5p	↓	
RRMS vs. Kontrol	Serum	miR-326-5p	↑	Niwald vd., 2017
		miR-155-5p	↓	
RRMS vs. Kontrol	Serum	miR-484	↑	Regev vd., 2018
RRMS vs. Kontrol	Serum	miR-191-5p, miR-24-3p	↑	Vistbakka vd., 2018
RRMS vs. Kontrol	Plazma	miR-20-5p	↑	Balkan & Bilge, 2021
		miR-26-5p, miR-155-5p	↓	

↑: miRNA rölaf ekspresyon seviyesi artmıştır. ↓: miRNA rölaf ekspresyon seviyesi azalmıştır.

Fenoglio ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ise miR-15b-5p ($P<.001$), miR-23a-5p ($P<.001$) ve miR-233-3p'nin ($P<.001$) dolaşımdaki ekspresyon seviyelerinin RRMS hastalarında kontrol grubuna göre düşük olduğu görülmüştür (Fenoglio vd., 2016). Oligodendrosit farklılaşmasında görev alan miR-23a-5p'nin aktif ve kronik MS lezyonlarında ifade edildiği bilinmektedir. Ayrıca hem miR-23a-5p'nin hem de miR-15b-5p'nin demiyelinizasyonda ve remiyelinizasyonda rol oynayan *FGF2* (fibroblast growth factor-2 – *FGF2*) genini hedeflediği bilinmektedir. Yine bu çalışmada RRMS hastalarında serum ekspresyon seviyesi düşük olan miR-233-3p de *STAT5A* (signal transducer and activator of transcription 5A – *STAT5A*) ve *HSP90* (heat shock protein 90 – *HSP90*) gibi MS progresyonunda görev alan enflamatuvar düzenleyicileri hedeflediği bilinmektedir (Ebrahimkhani vd., 2017). miR-23a-5p'nin ve miR-15b-5p'nin ekspresyon seviyelerindeki azalma, *FGF2* genin ekspresyonun ve hastalık aktivitesinin artması; miR-233-3p'nin serum ekspresyon seviyesindeki azalma da enflamatuvar yanıtların düzenlenmesi sebebiyle MS hastalığıyla ilişkilendirilmiştir (Ebrahimkhani vd., 2017; Fenoglio vd., 2016).

Enflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde rolü olan miRNA'lardan olan miR-34a-5p ($P<.001$) ve miR-125a-5p'nin ($P=.03$) plazma ekspresyon seviyelerinin RRMS hastalarında kontrollere göre daha yüksek olduğu ancak yine enflamasyonla ilişkili olduğu bilinen miR-146a-5p'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyesinin kontrollere göre RRMS hastalarında daha düşük olduğu gösterilmiştir ($P=.04$) (Giuliani vd., 2021). miR-125a-5p'nin KBB'nin bütünlüğünü koruyarak proenflamatuvar sitokinlerin beyin endotel hücreleri tarafından salınmasını önleyerek nöroenflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (Reijerkerk vd., 2013). Artan miR-146a-5p seviyelerinin IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin seviyelerini azaltarak enflamasyonu düşürebileceği görülmüştür (Saba vd., 2014). Aynı çalışmada dimetil fumarat tedavisi alan RRMS hastalarında tedaviye başladıktan 4 ay sonra dolaşımdaki miR-125a-5p ve miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Giuliani vd., 2021). Bir başka çalışmada ise IL-4 inhibisyonu yoluyla proenflamatuvar yanıtın desteklenmesinde etkili olan miR-128-5p'nin plazma rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS hastalarında SPMS hastalarına göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.04$) (Zanoni vd., 2020). Bu sonuçlar, dolaşımdaki miRNA'ların MS'in klinik alt tiplerinin ayırımında ve tedavi yanıtının değerlendirilmesindeki potansiyellerini göstermektedir.

Çizelge 4.5: RRMS hastalarında serum veya plazmada ekspresyon seviyesi değişen miRNA'ların MS'te muhtemel biyolojik işlevleri.

miRNA	Hedefleri (Gen-Yolak)	Etkisi	Referanslar
miR-145-5p	<i>Nurr1</i>	<i>Nurr1</i> (nuclear receptor related 1 protein – <i>Nurr1</i>) ekspresyonunu baskılar ve buna bağlı olarak TNF- α ile ilişkili nöron hasarına yol açar.	Xie vd., 2017
miR-30b-5p	<i>SEMA3A</i>	<i>SEMA3A</i> (semaphorin 3A – <i>SEMA3A</i>) ifadesini düzenleyerek Nörotrofin/Trk yolağı üzerinden nöronal rejenerasyonu destekler.	Ebrahimkhani vd., 2017
miR-572-5p	<i>NCAM</i>	Nöron büyümesi, MSS'nin onarımı ve remiyelinizasyonda rol oynayan NCAM (neural cell adhesion molecule – NCAM) proteinini hedefler.	Mancuso vd., 2015
miR-15b-5p	<i>FGF2</i>	Demiyelinizasyonda ve remiyelinizasyonda rol oynayan <i>FGF2</i> (fibroblast growth factor-2 – <i>FGF2</i>) genini hedefler.	Fenoglio vd., 2013
miR-23a-5p	<i>FGF2</i>	Kronik ve aktif MS lezyonlarında ifade edilmektedir. Ayrıca nöron ve oligodentrositlerin farklılaşmasında rol alır.	Fenoglio vd., 2013
miR-233-3p	<i>STAT5A</i> , <i>HSP90</i>	<i>STAT5A</i> (signal transducer and activator of transcription 5A – <i>STAT5A</i>) ve <i>HSP90</i> (heat shock protein 90 – <i>HSP90</i>) gibi MS progresyonunda görev alan enflamatuvar düzenleyicileri hedefler.	Fenoglio vd., 2013
miR-125a-5p	<i>EDN1</i>	<i>EDN1</i> (endothelin-1 – <i>ET1</i>) genini hedefleyerek KBB'nin bütünlüğünü korumada görev alır.	Reijerkerk vd., 2017
miR-146a-5p	TLR/NF- κ B	IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin seviyelerini düzenleyerek enflamasyonu azaltabilir.	Saba vd., 2014
miR-128-5p	<i>IL4</i>	<i>IL4</i> inhibisyonu yoluyla proenflamatuvar yanıtı destekler.	Zanoni vd., 2020
miR-22-5p	<i>BTG1</i>	B hücrelerinin çoğalmasını ve kontrolsüz gelişimini baskılamakta görevli <i>BTG1</i> (B-cell translocation gene 1 – <i>BTG1</i>) genini hedefler.	Gandhi vd., 2013
miR-30e-5p	<i>MAPK8</i> , <i>PIK3R2</i>	<i>MAPK8</i> (mitogen-activated protein kinase 8 – <i>MAPK8</i>) ve <i>PIK3R2</i> (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2 – <i>PIK3R2</i>) genlerini hedefleyerek immün sistem hücreleri arası iletişimi düzenler.	Gandhi vd., 2013
miR-140-3p	NF- κ B	NF- κ B'nin TNF- α aracılı aktivasyonunu düzenler.	Gandhi vd., 2013
miR-210-5p	<i>STAT3</i>	<i>STAT3</i> (signal transducer and activator of transcription 3 – <i>STAT3</i>) yolağının TGF- β aracılı aktivasyonunu sağlar.	Gandhi vd., 2013

Çizelge 4.5 (devam): RRMS hastalarında serum veya plazmada ekspresyon seviyesi değişen miRNA'ların MS'te muhtemel biyolojik işlevleri.

miRNA	Hedefleri (Gen-Yolak)	Etkisi	Referanslar
miR-500-5p	<i>ESR</i>	Th1/Th2 dengesinin bozulmasına ve IFN- γ gibi enflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar.	Gandhi vd., 2013
miR-574-3p	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD4</i> (mothers against decapentaplegic homolog 4 – <i>SMAD4</i>) ifade seviyesini düzenleyerek naif T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşümünü indükler.	Gandhi vd., 2013
miR-92a-1	CD40 yolağı	Naif T hücrelerinin aktivasyonu ve çoğalmasıyla ilişkilidir.	Gandhi vd., 2013
miR-135a-5p	JAK2/STAT3	JAK2 (janus kinase 2 – JAK2) /STAT3 yolağı üzerinden Th17 hücreleri aracılığı ile proenflamatuvar sitokinlerin salınımını indükler.	Gandhi vd., 2013
miR-454-5p	<i>PDK1</i>	<i>PDK1</i> (phosphoinositide-dependent kinase-1 – <i>PDK1</i>) geninin hedefleyerek Treg hücrelerinin çoğalmasını baskılar.	Gandhi vd., 2013
miR-155-5p	<i>SOCS1</i> , <i>SHIP1</i>	<i>SOCS1</i> (suppressor of cytokine signaling protein 1 – <i>SOCS1</i>) ve <i>SHIP1</i> (src homology domain 2-containing inositol 5-phosphatases 1 – <i>SHIP1</i>) gibi sitokin sinyalizasyonunun negatif regülatörlerinin ifade seviyesini azaltarak enflamatuvar süreçleri artırır.	Niwald vd., 2017; Balkan & Bilge vd., 2021; Huang vd., 2013
miR-301a-5p	<i>STAT3</i>	<i>STAT3</i> ekspresyonunu düzenleyerek enflamatuvar süreçlerin artmasına neden olur.	Niwald vd., 2017; Balkan & Bilge vd., 2021
miR-326-5p	<i>ETS-1</i>	Th-17 hücrelerinin negatif düzenleyicisi olan Ets-1'i hedef alarak Th17 farklılaşmasını destekler.	Niwald vd., 2017; Du vd., 2009
miR-191-5p	<i>IRS1</i>	Naif, hafıza ve düzenleyici T hücrelerinin üzerinde etkili olan ve <i>IRS1</i> (insulin receptor substrate 1 – <i>IRS1</i>) genini hedefleyerek naif ve düzenleyici T hücrelerinin metabolizmasını düzenler.	Vistbakka vd., 2018
miR-24-3p	<i>IFN-γ</i> , <i>IL4</i>	IFN- γ ve IL-4 ekspresyon seviyesini inhibe ederek enflamatuvar yanıtların oluşmasında görev alır.	Vistbakka vd., 2018
miR-20a-5p	<i>TIMP2</i>	<i>TIMP2</i> (tissue inhibitor of metalloproteinases 2 – <i>TIMP2</i>) ekspresyonu baskılayarak KBB'nin bütünlüğünü sağlayan <i>MMP2</i> 'nin (matrix metalloproteinase 2 – <i>MMP2</i>) ekspresyon seviyesinin artmasında görev alır.	Balkan & Bilge vd., 2021; Huang vd., 2013
miR-26-5p	<i>IL17</i>	IL-17 aracılı Th17 farklılaşmasını düzenler.	Balkan & Bilge vd., 2021

B hücrelerinin çoğalmasını ve kontrolsüz gelişimini baskılamakta görevli *BTG1* (B-cell translocation gene 1 – *BTG1*) genini hedefleyen miR-22-5p'nin plazma rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS hastalarında kontrollere göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.01$) (Gandhi vd., 2013). Yine aynı çalışmada miR-30e-5p'nin plazma rölatif ekspresyon seviyesi RRMS hastalarında kontrollere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($P=.02$). miR-30e-5p, *MAPK8* (mitogen-activated protein kinase 8 – *MAPK8*) ve *PIK3R2* (phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2 – *PIK3R2*) genlerini hedefleyerek immün sistem hücreleri arası iletişimi bozup ve otoimmün tepkilere yol açıp MS patogeneze katkıda bulunmaktadır (Gandhi vd., 2013). NF- κ B'nin TNF- α aracılı aktivasyonunu düzenleyen miR-140-3p'nin ($P=.01$) ve *STAT3* (signal transducer and activator of transcription 3 – *STAT3*) yolağının TGF- β aracılı aktivasyonunu sağlayan miR-210-5p'nin ($P=.003$) RRMS hastalarının plazmalarında kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede ifade edildiği görülmüştür (Gandhi vd., 2013). T hücre ve nötrofile özgü bir markör olan miR-500-5p'nin ($P=.001$) ve naif T hücrelerinin, Th17 hücrelerine dönüşümünü indükleyen miR-574-3p'nin ($P=.01$) de hasta grubunda kontrollere göre daha yüksek seviyede ifade edildiği gösterilmiştir (Gandhi vd., 2013). Hücre döngüsünü düzenlemede ve hücre sinyallemede rol oynayan gen hedeflerine sahip miR-92a-1 ($P=.002$) ve miR-135a-5p'nin ($P=.04$) ve *PDK1* (phosphoinositide-dependent kinase-1 – *PDK1*) genini hedefleyerek Treg hücrelerinin çoğalmasını baskılayan miR-454-5p'nin ($P=.03$) de RRMS hastalarında SPMS hastalarına göre daha düşük ekspresyon seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir (Gandhi vd., 2013). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar miRNA'ların immün sistem hücrelerini ve immün yanıtlarını düzenleyerek MS hastalığının immünopatogenezi etkileyebileceğini göstermektedir.

Daha önce de bahsedildiği üzere MS'te Th17 hücrelerinin enflamasyonu ve nöronal hasarı arttırdığı bilinmektedir. Al-Temaimi ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada naif T hücrelerinin Th17 hücrelerine dönüşümünü indükleyen miR-326-5p'nin serum ekspresyon seviyesinin RRMS hastalarında kontrollere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir ($P=.003$). Aynı çalışmada otoimmün ve enflamatuvar yanıtların oluşmasına neden olan miR-150-5p'nin serum ekspresyon seviyesinin RRMS hastalarında SPMS hastalarına göre daha düşük olduğu gösterilmiştir ($P<.001$) (Al-Temaimi vd., 2024).

Enflamatuvar yanıtının ve bağışıklık tepkisinin ana düzenleyicisi rolünde tanımlanan miR-155-5p'nin RRMS hastalarındaki serum ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bildirilmiştir ($P=.03$) (Huang vd., 2013; Niwald vd., 2017). Aynı çalışmada MS patogenezinde yer alan Th-17 hücrelerinin negatif düzenleyicisi olan Ets-1'i hedef alarak Th17 farklılaşmasını destekleyen miR-326-5p'nin de RRMS hastalarında serum ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ($P=.03$) (Du vd., 2009; Niwald vd., 2017). Regev ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada RRMS hastalarında serum miR-484-5p ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu görülmüştür ($P=.004$) (Regev vd., 2018). miR-484-5p'nin düşük ekspresyon seviyelerinin düzensiz sinaptogeneze neden olduğu ve bilinen bu görevinden dolayı epilepsi, otizm ve hiperaktivite gibi nörogelişimsel rahatsızlıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. MS hastalarında dolaşımdaki artan ekspresyonu MSS'de devam eden iyileşme sürecinin bir göstergesi olarak açıklanmıştır (Fujitani vd., 2017; Regev vd., 2018).

Naif, hafıza ve düzenleyici T hücrelerinin üzerinde etkili olan ve *IRS1* (insulin receptor substrate 1 – *IRS1*) genini hedefleyerek naif ve düzenleyici T hücrelerinin metabolizmasını düzenleyen miR-191-5p'nin ise RRMS hastalarında serum ekspresyon seviyelerinin kontrollere göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.01$) (Vistbakka vd., 2018). IFN- γ ve IL-4 ekspresyon seviyesini inhibe ederek enflamatuvar yanıtının oluşmasından görevli miR-24-3p'nin de RRMS hastalarında serum ekspresyon seviyelerinin kontrollere göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.01$) (Vistbakka vd., 2018).

Balkan ve Bilge'nin çalışmasında *TIMP2* (tissue inhibitor of metalloproteinases 2 – *TIMP2*) ekspresyonu baskılayarak KBB'nin bütünlüğünü sağlayan *MMP2*'nin (matrix metalloproteinase 2 – *MMP2*) ekspresyon seviyesinin artmasında görev aldığı bilinen miR-20-5p'nin plazma ekspresyon seviyelerinin RRMS hastalarında kontrollere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur ($P=.01$). MS hastalığının seyrinde koruyucu bir etkiye sahip olduğu düşünülen bu miRNA'nın ekspresyonunun hasta grubunda yüksek olmasının, çalışma popülasyonunu oluşturan RRMS'li hastaların tedavi almalarından kaynaklandığı öngörülmüştür. Ayrıca, IL-17 aracılı Th17 farklılaşmasını düzenleyen miR-26-5p'nin de plazmadaki ekspresyon seviyesinin RRMS hastalarında kontrollere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir ($P=.03$) (Balkan & Bilge, 2021).

4.5.1.1 Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS ile ilişkisinin incelenmesi

Bu tez çalışmasında naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P=.56$) (izelge 3.22). miR-146a-5p, TLR/NF-κB sinyal yolağının ana negatif düzenleyicisidir. NF-κB ise *MIR146A* genini pozitif olarak düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Olgun miR-146a-5p, TLR/NF-κB yolağının pozitif düzenleyici sinyal bileşenleri olan *TRAF6* ve *IRAK1* genlerini inhibe ederek TLR/NF-κB sinyalleşmesinin düzenlemesine negatif bir geri besleme döngüsüyle etki eder (Iacona & Lutz, 2019; Iyer vd., 2012). IRAK1 ve TRAF6 IκB'nin fosforilasyonuna ve bozulmasına neden olarak, NF-κB'nin aktivasyonuna ve çekirdeğe geçişine yol açar. ekirdeđe giren transkripsiyon faktörü NF-κB, *MIR146A* ve birçok enflamatuar genin transkripsiyonunu indükleyerek enflamatuar sitokinlerin sentezini etkiler. Dolaşımdaki yüksek miR-146a-5p seviyelerinin MS'e bağlı engelliliğin ilerlemesi ve hastalığın olumsuz seyriyle ilişkilendirilmesi (Casanova vd., 2023) ve MS'in bir hayvan modeli olan EAE'de hastalığı şiddetlendiren strese maruz kalmanın miR-146a-5p ekspresyon seviyelerini arttırması (Gerrard vd., 2017), bu miRNA'nın enflamatuar yanıtlar üzerinden hastalıkla ilişkilendirilmesini desteklemektedir. Bununla birlikte, miR-146a-5p ve NF-κB'nin arasındaki negatif geri besleme döngüsünün karmaşıklığı, artan miR-146a-5p ekspresyon seviyelerinin enflamatuar yanıtları baskılamasını da mümkün kılmaktadır. Aktive olmuş NF-κB'nin *MIR146A* genindeki promotör bölgeye bağlanmasıyla ekspresyonu artan olgun miR-146a-5p, *IRAK1* ve *TRAF6*'yı inhibe ederek TLR/NF-κB sinyal yolağının inhibisyonuna neden olmaktadır. Artan miR-146a-5p seviyelerinin IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF-α gibi proenflamatuar sitokinlerin seviyelerini azaltarak enflamasyonu d ş rebileceğinin de gösterilmesi (Saba vd., 2014), nörodejeneratif hastalıklarda artan miR-146-5p ekspresyon seviyesinin proenflamatuar ve antienflamatuar yanıtlar üzerinden ikili bir role sahip olabileceğini düşündürtmektedir (Juźwik vd., 2019). *IRAK1* ve *TRAF6*'nın miR-146a-5p tarafından hedeflenmesi ve inhibisyonunun T hücre yapışmasını azaltarak bağışıklık sistemi hücrelerinin KBB'yi geçme yeteneğini bozması *in-vitro* bir çalışmada gösterilmiştir (Wu vd., 2015). Ayrıca miR-146a-5p'nin yüksek seviyede ekspresyonunun demiyelinizan EAE modellerinde

IRAK1'i inhibe ederek OPC'lerin olgun, miyelin üreten oligodendrositlere farklılaşmasını teşvik ederek remiyelinizasyonu desteklediğine dair sunulan deneysel sonuçlar (Zhang vd., 2017), miR-146a-5p'nin MS gibi nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu bir rol oynayabileceğini desteklemektedir. Literatürdeki sonuçlara bakıldığında da miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin MS hastalarının PBMC'lerinde (Fenoglio vd., 2012), aktif lezyonlarında (Martin vd., 2020) ve BOS'larında (Perdaens vd., 2020) kontrollere göre daha yüksek olduğu görülürken; serum ve plazma ekspresyon seviyesinin hastalarda kontrollere göre daha düşük olduğu gösterilmiştir (Giuliani vd., 2021; Perdaens vd., 2020). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında hasta ve kontrol gruplarının plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaması ve literatürde farklı doku örneklerinde düşük ve yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olması, bu miRNA'nın karmaşık negatif geri besleme döngüsünden dolayı MS hastalığının patogenezinde ve progresyonunda birçok farklı görevde rol almasıyla bağdaştırılabilir. Bu çalışmada fingolimod tedavisinin plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle ilişkisi de çalışılmıştır. Literatürde daha önce fingolimod tedavisiyle ilişkisi çalışılmamış olsa da miR-146a-5p'nin glatiramer asetat tedavisi alan hastaların PBMC'lerinde ekspresyon seviyesinin tedavi almayan hastalara göre daha az olduğu gösterilmiştir (Waschbisch vd., 2011). Bir başka çalışmada ise dimetil fumarat tedavisi alan RRMS hastalarında tedaviye başladıktan 4 ay sonra dolaşımdaki miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (Giuliani vd., 2021). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri fingolimod tedavisiyle ilişkili bulunmamış olsa da hastaların tedavi başlangıcından itibaren takip edildiği, tedaviye başlamadan ve tedaviye başladıktan sonra belli aralıklara ve engellilik skorlarıyla birlikte plazma miR-146-5p ekspresyon seviyelerinin incelendiği boylamsal çalışmalarla, bu miRNA'nın fingolimod tedavisindeki rolünün anlaşılması için daha kapsamlı sonuçlar elde edilebilir.

Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotip ve genotip modellerine (kodominant, resesif ve dominant) göre karşılaştırılmıştır. Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri hem genotip ve genotip modellerine göre hasta ve kontrol grupları içerisinde hem de aynı genotipe sahip naif RRMS, fingolimod

tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin genotipleri ile plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin birlikte analizi sonucunda naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında farklı genotipe sahip bireyler arasında kodominant, dominant ve resesif modele göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir (Çizelge 3.23). *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'si, pre-miR-146a'nın saç tokası yapısı içinde bulunduğu için saç tokası yapısının sahip olduğu Gibbs serbest enerjisinin değişmesine yol açığı bilinmektedir (Iwai & Naraba, 2005; Rehmsmeier vd., 2004). Meydana gelen bu değişikliğin birincil ve öncül miRNA'ların stabilitesini ve miRNA biyogenezinde görev alan proteinlerle eşleşmelerini bozarak, olgun miR-146a-5p ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olduğu görülmüştür. Öyle ki G aleli ile karşılaştırıldığında C alelinin birincil miR-146a-5p seviyesini 1.9 kat, olgun miR-146a-5p seviyesini de 1.8 kat azalttığı gösterilmiştir (Jazdzewski vd., 2008). Ayrıca Alzheimer hastalarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada da CC genotipine sahip hastaların serum miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin GG genotipine sahip hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2015). Buna benzer olarak GG genotipine sahip tip 2 diyabet hastalarının da PBMC'lerinde miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin CC genotipine sahip hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür (Alipoor vd., 2018). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile rs2910164 SNP'sinin genotipleri arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri çalışmalarının gerçekleştirdiği Grup-2 çalışma popülasyonunda görece daha az sayıda örnek bulunmaktadır. Hasta ve kontrol grupları genotiplere göre ayrıldığında naif RRMS grubunda beş, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda iki ve kontrol grubunda dört kişinin CC genotipine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum gruplar içerisinde farklı genotiplere sahip bireyler arasında gerçekleştirilen karşılaştırma analizleri sonuçlarının istatistiksel olarak çok güçlü olmadığını gösterir. Daha büyük popülasyonlarda gerçekleştirilecek analizlerde daha güçlü sonuçların elde edilebileceği ve *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin görülebileceği düşünülmektedir. Aynı genotipe sahip bireyler gruplar arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

olmadığı görülmüştür. Bu durum gruplar arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından fark olmamasıyla ilişkilendirilebilir.

Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin MS hastalarının demografik ve klinik bilgileriyle olan ilişkileri, demografik ve klinik kategorik parametrelere göre oluşturulan gruplar arası karşılaştırma ve korelasyon analizleriyle incelenmiştir. Buna göre naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında demografik ve klinik parametrelere, EDSS skorlarına ve MSSS değerlerine göre oluşturulan gruplar arasında plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde düşük ve yüksek plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesine sahip hastalar arasında da klinik parametreler karşılaştırıldığında naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS gruplarında düşük ve yüksek plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerine sahip hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her ne kadar RRMS hastalarıyla gerçekleştirilen bir çalışmada serum miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile EDSS skorları arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülsede (Dominguez-Mozo vd., 2022) gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle sadece plazma miR-155-5p ($p=596$, $P=.001$) ve miR-196a-5p ($p=527$, $P=.003$) seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Fingolimodun MSS içerisinde fosforile olduktan sonra proenflamatuar sitokinler üzerine olan etkileriyle enflamatuar yanıtları düzenlediği bilinmektedir (Coelho vd., 2007). Genel olarak miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p de enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde görev almaktadır. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyonun, hastalıkla oluşan enflamasyonun boyutuyla ve tedavinin enflama-miR'ler üzerindeki etkileriyle ilişkili olduğu düşünülebilir (Giuliani vd., 2021; Maciak vd., 2021).

Plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin diğer klinik ve demografik parametrelerle birlikte naif RRMS veya fingolimod tedavisi alan RRMS olma durumlarıyla ilişkisi bu tez çalışmasında ikili lojistik regresyon analizleriyle incelenmiştir. Hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılarak gerçekleştirilen bu analizlerde plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS hastası olma veya tedavi alma durumuyla ilişkili bulunmamıştır. Gruplar arası karşılaştırma

analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği ve lojistik regresyon analizlerinde de hastalık durumuyla ilişkilendirilemediği için plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin ROC analizleri gerçekleştirilmemiştir.

4.5.1.2 Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS ile ilişkilerinin incelenmesi

Bu tez çalışmasında naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmış ve gruplar arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P<.001$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna ve naif RRMS grubuna göre daha düşüktür (Çizelge 3.22). miR-155-5p enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde güçlü bir aktivatör olmasından dolayı enflama-miR olarak da adlandırılmaktadır (Maciak vd., 2021). B ve T hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması da dâhil olmak üzere birçok bağışıklık sürecinin düzenlenmesinde görev aldığı ve enflamatuar süreçlerin başlangıcında kritik bir rolü olduğu bilinmektedir (Xiaoyan vd., 2017). Ek olarak, miR-155-5p'nin NF- κ B sinyal yolunu baskılayarak IL-1 β tarafından indüklenen enflamasyonu etkili bir şekilde azalttığı ve TLR sinyal yolunu düzenleyerek enflamatuar yanıtların düzenlenmesine katkı sağladığı da bilinmektedir (Hu vd., 2022; Liu vd., 2019; Korotkov vd., 2020). Enflamatuar yanıtın kontrolünde görev alan *SHIP1* ve *SOCS1*'in miR-155-5p tarafından düzenlenmesinin yanı sıra, bu miRNA'nın NF- κ B'ye bağımlı bir miRNA olması ve farklı hedefler üzerinden enflamatuar yanıtların değişiminde görev alması, miR-155-5p'yi enflamatuar yanıtın kontrolü için potansiyel bir hedef haline getirmektedir. Makrofajlar ve mikrogliyalarda *SOCS1* ve *SHIP1* gibi enflamasyon inhibitörlerini modüle ederek ve mikrogliyalarda transkripsiyonel faktör p53 tarafından aktive edildikten sonra, anti-enflamatuar süreçleri etkileyen c-Maf'ı hedefleyerek enflamasyonu indüklediğinin gösterilmesi, kronik enflamatuar hastalıklarla olan ilişkisini desteklemektedir (Cardoso vd., 2012; O'Connell vd., 2012; Su vd., 2014; Hu vd., 2022; Xu vd., 2022). Enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde görev almasının yanı sıra, miR-155-5p B hücrelerinin üretiminde, CD8⁺ T hücrelerinin modülasyonunda, CD4⁺ T hücrelerinin Th1, Th2, Th17 ve Treg hücrelerine

farklılaşmasında, sitokinlerin ve kemokinlerin düzenlenmesinde ve bazı transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasında etkin rol alarak immün sistem homeostazının ve bağışıklık sistemi yanıtlarının da önemli bir düzenleyicisi rolündedir (Rodriguez vd., 2007; Seddiki vd., 2014). Enflamatuvar yanıtların ve bağışıklık tepkisinin ana düzenleyicisi rolünde tanımlanan miR-155-5p'nin, nörodejeneratif hastalıklarda artan ekspresyonuyla birlikte nöroenflamasyonu da artırarak hastalık progresyonunu hızlandırabileceği düşünülmektedir (Jużwik vd., 2019). MS ile ilişkisinin incelendiği çalışmalarda RRMS hastalarında atak dönemlerinde dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin arttığının bildirilmesi de miR-155-5p'nin MS hastalığındaki rolüyle ilişkilendirilmektedir (Niwald vd., 2017). Literatürde artmış miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin MS hastalığı ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, Balkan ve Bilge'nin gerçekleştirdiği çalışmada MS hastalarında dolaşımdaki miR-155-5p ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunun görülmesi, çalışma popülasyonunu oluşturan RRMS'li hastaların tedavi almalarıyla ilişkilendirilmiştir (Balkan & Bilge, 2021). Çünkü natalizumab ve dimetil fumarat tedavisi alan RRMS'li hastalarda tedaviye başladıktan sonra miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin azaldığının gösterilmesi miR-155-5p'nin MS hastalığının tedavisi için iyi bir hedef olduğunu düşündürmektedir (Giuliani vd., 2021; Mameli vd., 2016; Mohammed, 2018). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında da fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin tedavi almayan, naif RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olması literatürde miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin farklı MS tedavileriyle ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Her ne kadar tedavi yanıtının değerlendirilmesine uygun bir deney dizaynına sahip olunmasa da fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS grubuna göre daha düşük olması, immün sistem ve enflamatuvar yanıtlar üzerinden etkinlik gösteren fingolimod tedavisi ile miR-155-5p ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin genotip ve genotip modellerine (kodominant, resesif ve dominant) göre karşılaştırılmıştır. Plazma miR-

155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri hem genotip ve genotip modellerine göre hasta ve kontrol grupları içerisinde hem de aynı genotipe sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında kar ıla tırılmı tır. Hasta ve kontrol grupları içerisinde farklı genotiplere sahip bireyler arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. *MIR155* rs767649 T/A SNP'si gen ekspresyonunu başlatan promotör bölgede bulunmaktadır ve A alelinin bu bölgeye NF- B gibi transkripsiyon faktörlerinin ba lanması bozarak olgun miRNA ekspresyon seviyesini azalttığı bilinmektedir (Xie vd., 2015). Hepatoselüler karsinom, meme kanseri ve akciğer kanseri gibi farklı kanser türlerine sahip hastalar içerisinde rs767649 SNP'sinin T aleline sahip bireylerin daha yüksek miR-155-5p ekspresyon seviyelerine sahip olduğu da gösterilmiştir (Dezfuli vd., 2020; Iranparast vd., 2023; Karajovic vd., 2024). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile rs767649 SNP'sinin genotipleri arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri çalışmalarının gerçekleştirdiği Grup-2  alı ma popülasyonunda görece daha az sayıda örnek bulunmaktadır. Hasta ve kontrol grupları genotiplere göre ayrıldığında naif RRMS grubunda bir kişinin AA genotipine sahip olduğu görülürken, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda ve kontrol grubunda AA genotipine sahip birey bulunmamaktadır. Bu durum gruplar içerisinde farklı genotiplere sahip bireyler arasında gerçekleştirilen karşılaştırma analizleri sonuçlarının istatistiksel olarak güçlü olmadığını gösterir. Daha büyük popülasyonlarda gerçekleştirilecek analizlerde daha güçlü sonuçların elde edilebileceği ve *MIR155* rs767649 T/A SNP'sinin miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin görülebileceği düşünülmektedir. Aynı genotipe sahip bireyler, gruplar arasında kar ıla tırıldı ında TT genotipine sahip fingolimod alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P<.001$). Gruplar arasında TA genotipine sahip bireyler kar ıla tırıldı ında, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P=.03$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P=.03$). Aynı genotipe

sahip bireyler, gruplar arasında karşılaştırıldığında TT veya TA genotipine sahip fingolimod alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P<.001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P<.001$). TA veya AA genotipine sahip bireyler gruplar arasında karşılaştırıldığında TA veya AA genotipine sahip fingolimod alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı derece düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P=.03$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P=.03$). Aynı genotipe sahip bireylerin gruplar arası karşılaştırma analizlerinde plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından fark olması gruplar arası karşılaştırma analizleri sonucunda da plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından gruplar arasında fark görülmesiyle açıklanabilir. Gruplar arası karşılaştırma analizlerinde fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunun görülmesi, hasta ve kontrol gruplarındaki bireyler sahip oldukları genotiplere göre gruplandırılıp gruplar arasında karşılaştırıldığında da fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin düşük olmasıyla benzerlik göstermektedir.

Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin MS hastalarının demografik ve klinik bilgileriyle olan ilişkileri, demografik ve klinik kategorik parametrelere göre oluşturulan gruplar arası karşılaştırma ve korelasyon analizleriyle incelenmiştir. Buna göre naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında demografik ve klinik parametrelere, EDSS skorlarına ve MSSS değerlerine göre oluşturulan gruplar arasında plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde düşük ve yüksek plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesine sahip hastalar arasında da klinik parametreler karşılaştırıldığında naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS gruplarında düşük ve yüksek plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerine sahip hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Korelasyon analizleri sonuçlarına bakıldığında, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif

ekspresyon seviyeleriyle plazma miR-146-5p ($\rho=596$, $P=.001$) ve miR-196a-5p ($\rho=556$, $P=.002$) seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Fingolimodun MSS içerisinde fosforile olduktan sonra proenflamatuar sitokinler üzerine olan etkileriyle enflamatuar yanıtları düzenlediği bilinmektedir (Coelho vd., 2007). Genel olarak miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p de enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde görev almaktadır. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyonun, hastalıkla oluşan enflamasyonun boyutuyla ve tedavinin enflama-miR'ler üzerindeki etkileriyle ilişkili olduğu düşünülebilir (Giuliani vd., 2021; Maciak vd., 2021). Korelasyon analizlerine göre dikkat çekici bir diğer sonuç fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile serum 25-(OH) D₃ düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon görülmesidir ($\rho=521$, $P=.004$). *In vivo* ve *in vitro* olarak rotavirüs enfeksiyonuna yanıt olarak artan miR-155-5p ekspresyon seviyesinin 25-(OH) D₃ ile inkübasyondan sonra baskılandığı görülmüştür. D vitaminin, TBK1 (TANK binding kinase 1 – TBK1) /IRF3 (interferon regulatory factor 3 – IRF3) sinyal yolunun miR-155-5p aracılı düzenlemesi yoluyla rotavirüs enfeksiyonunu hafiflettiği bildirilmiştir (Y. Zhao vd., 2019). Bağışıklık tepkilerinin ve viral enfeksiyonların düzenlenmesinde D vitamini ile miR-155-5p arasında potansiyel bir etkileşim olduğunu göstermekte olsa da serum 25-(OH) D₃ düzeyleri ve miR-155-5p ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizmaların ve çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçler üzerindeki birleşik etkilerinin anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin diğer klinik ve demografik parametrelerle birlikte naif RRMS veya fingolimod tedavisi alan RRMS olma durumlarıyla ilişkisi bu tez çalışmasında ikili lojistik regresyon analizleriyle incelenmiştir. Hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılarak gerçekleştirilen bu analizlerde plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin azalmasıyla fingolimod tedavisi alan RRMS olma riski anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur ($OR=0.013$, $P=.001$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olması da ikili lojistik regresyon analizlerinde azalan plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin fingolimod tedavisi alan RRMS olma riskiyle ilişkili bulunmasını

destekler niteliktedir. Gerçekleştirilen ROC analizlerine göre de plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS hastaları ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için zayıf derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.691, $P=.01$). Ayrıca, plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin tedavi alan RRMS ve naif RRMS hastalarının sınıflandırılması için iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülürken (AUC=0.890, $P<.001$), fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için çok iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.923, $P<.001$) ( izelge 3.48).

4.5.1.3 Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin RRMS ile ilişkilerinin incelenmesi

Bu tez çalışmasında naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri kar ıla tırılmı  ve gruplar arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P=.02$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P=.02$). Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri, naif RRMS grubunun plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha d  st r ( izelge 3.22). miR-196a-5p'nin nöron gelişiminde, canlılığında ve işlevlerinin sürdürülmesinde görev alan *BDNF* genini ve *HOX* kümelerini hedefleyerek nörodejeneratif bir hastalık olan Huntington hastalığının progresyonunda anahtar bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Wang vd., 2020). Ek olarak gerçekleştirilen *in silico* analizler sonucunda miR-196a-5p'nin, sistemik skleroz ve polimiyozit gibi otoimmün hastalıkların patogenezinde yer aldığı düşünülen düzenleyici yolları hedeflediği ve bu sebeple hastalık progresyonuyla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Gao vd., 2019; Jin vd., 2023). miR-196a-5p'nin MS ile ilişkisinin incelendiği sınırlı sayıda çalışma olsa da atak dönemindeki RRMS'li hastaların PBMC'lerinde miR-196a-5p ekspresyon seviyesinin iyileşme dönemindeki hastaların PBMC'lerinden anlamlı derecede daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum miR-196a-5p'nin MS'te atak ve iyileşme dönemlerinin moleküler i leyi inde kritik bir rol oynadığını d   nd rtm  t r (Baulina vd., 2018). MS hastalarında tedaviyle ilişkisi daha önce hiç  alı ılmamı  olan miR-196a-5p'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyelerinin de MS hastalığındaki rolüne dair örnek bir

Çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında ilk kez dolaşımdaki miR-196a-5p ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisiyle olan ilişkisi çalışılmış ve fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS grubuna göre daha düşük olması, immün sistem ve enflamatuvar yanıtlar üzerinden etkinlik gösteren fingolimod tedavisi ile miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Fingolimod tedavisi ile değişen plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi hakkında daha kapsamlı sonuçlara ulaşılması ve fingolimod tedavisinin moleküler işleyişinde bu miRNA'nın rolünün anlaşılması için gelecek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin genotip ve genotip modellerine (kodominant, resesif ve dominant) göre karşılaştırılmıştır. Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri hem genotip ve genotip modellerine göre hasta ve kontrol grupları içerisinde hem de aynı genotipe sahip naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol grupları arasında karşılaştırılmıştır. Hasta ve kontrol grupları içerisinde farklı genotiplere sahip bireyler arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'si pre-miR-196a2'nin 3' UTR bölgesinde bulunduğu için birincil ve öncül miRNA'ların olgun formuna işlenmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Öyle ki yapılan *in vitro* bir çalışmada pre-miR-196a2 üzerinde C alelini bulunduran hücrelerde olgun miRNA ekspresyon seviyesinin T alelini bulunduranlardan 4.9 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (Hoffman vd., 2009). Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile rs11614913 SNP'sinin genotipleri arasında anlamlı bir ilişki gözlemlenmemiştir. Plazma miRNA rölatif ekspresyon seviyeleri çalışmalarının gerçekleştirildiği Grup-2 alışma popülasyonunda görece daha az sayıda örnek bulunmaktadır. Hasta ve kontrol grupları genotiplere göre ayrıldığında naif RRMS grubunda dört, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda altı ve kontrol grubunda dört kişinin TT genotipine sahip olduğu görülmektedir. Bu durum gruplar içerisinde farklı genotiplere sahip bireyler arasında gerçekleştirilen karşılaştırma analizleri sonuçlarının istatistiksel olarak çok gll olmadığını gösterir. Daha büyük popülasyonlarda gerçekleştirilecek analizlerde daha

güçlü sonuçların elde edilebileceği ve *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin görülebileceği düşünülmektedir. Naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında aynı genotipe sahip bireyler, gruplar arasında karşılaştırıldığında CC veya CT genotipine sahip fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, aynı genotipe sahip naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin istatistiksel anlamda daha düşük olduğu görülmüştür (Tüm gruplar arası: $P=.01$; Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P=.02$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P=.047$). Aynı genotipe sahip bireylerin gruplar arası karşılaştırma analizlerinde plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından fark olması gruplar arası karşılaştırma analizleri sonucunda da plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından gruplar arasında fark görülmesiyle açıklanabilir. Gruplar arası karşılaştırma analizlerinde fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, naif RRMS grubuna göre plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğunun görülmesi, hasta ve kontrol gruplarındaki bireyler sahip oldukları genotiplere göre gruplandırılıp gruplar arasında karşılaştırıldığında da fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, naif RRMS ve kontrol grubuna göre plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin düşük olmasıyla benzerlik göstermektedir.

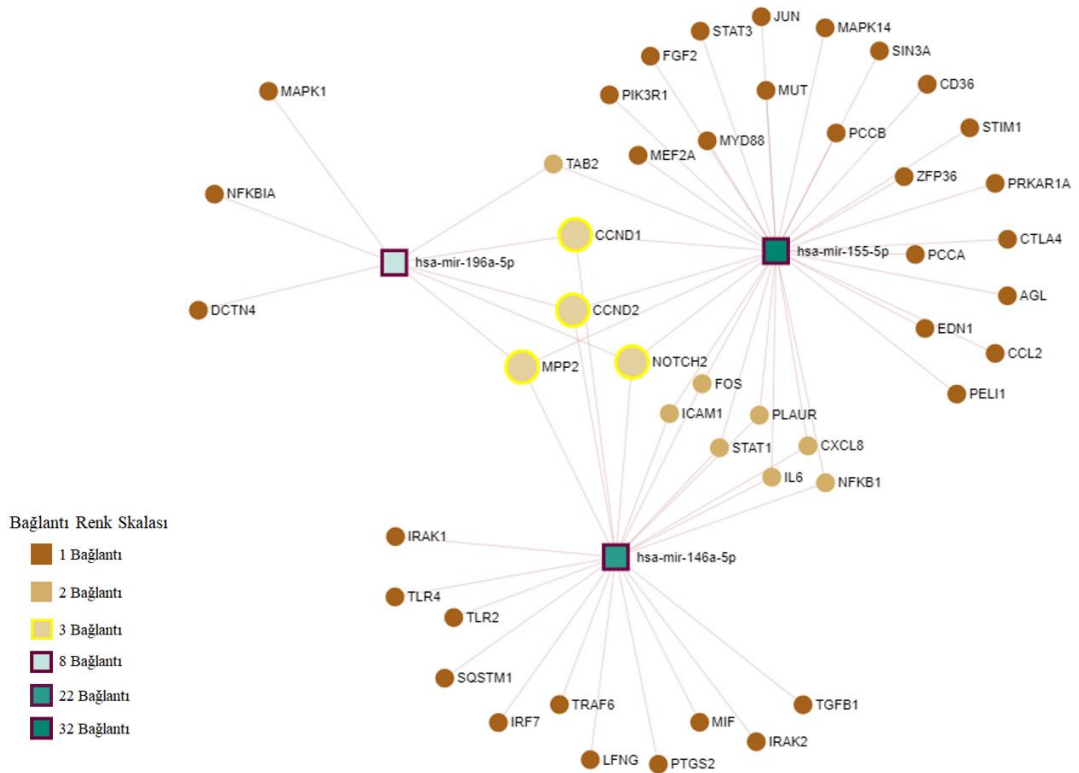
Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin MS hastalarının demografik ve klinik bilgileriyle olan ilişkileri, demografik ve klinik kategorik parametrelere göre oluşturulan gruplar arası karşılaştırma ve korelasyon analizleriyle incelenmiştir. Buna göre naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında demografik ve klinik parametrelere, EDSS skorlarına ve MSSS değerlerine göre oluşturulan gruplar arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Benzer şekilde düşük ve yüksek plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesine sahip hastalar arasında da klinik parametreler karşılaştırıldığında naif RRMS ve fingolimod tedavisi alan RRMS gruplarında düşük ve yüksek plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerine sahip hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Korelasyon analizleri sonuçlarına bakıldığında, fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle plazma miR-146-5p ($\rho=527$, $P=.003$) ve miR-155-5p

($p=556$, $P=.002$) seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür. Fingolimodun MSS içerisinde fosforile olduktan sonra proenflamatuar sitokinler üzerine olan etkileriyle enflamatuar yanıtları düzenlediği bilinmektedir (Coelho vd., 2007). Genel olarak miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p de enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde görev almaktadır. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda bu miRNA'ların ekspresyon seviyeleri arasındaki korelasyonun, hastalıkla oluşan enflamasyonun boyutuyla ve tedavinin enflama-miR'ler üzerindeki etkileriyle ilişkili olduğu düşünülebilir (Giuliani vd., 2021; Maciak vd., 2021). Korelasyon analizlerine göre dikkat çekici bir diğer sonuç fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile serum total kolesterol ($p=393$, $P=.04$) ve LDL-kolesterol ($p=440$, $P=.02$) düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon görülmesidir. miR-196a-5p'nin öncül yağ dokusu hücrelerinin çoğalması ve olgun yağ dokusu hücrelerine farklılaşması olan adipogenezde düzenleyici rolü olduğu bilinen *HOXC8* ve *SFMBT1* (Scm like with four mbt domains 1 – *SFMBT1*) genlerini hedeflemesi, lipid metabolizmasıyla arasındaki potansiyel ilişkiyi ve korelasyon analizlerinde elde edilen sonuçları desteklemektedir (Ghanbari vd., 2015). Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin diğer klinik ve demografik parametrelerle birlikte naif RRMS veya fingolimod tedavisi alan RRMS olma durumlarıyla ilişkisi bu tez çalışmasında ikili lojistik regresyon analizleriyle incelenmiştir. Hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılarak gerçekleştirilen bu analizlerde plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS hastası olma veya tedavi alma durumuyla ilişkili bulunmamış olsa da gruplar arası karşılaştırma analizlerinde hasta ve kontrol grupları arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldüğü için ROC analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ROC analizlerine göre plazma miR-196-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS hastalarının sınıflandırılması için orta derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür ($AUC=0.715$, $P=.005$) (Çizelge 3.48).

4.6 *In silico* Analizler ve miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin Ortak Hedefleri

Gerçekleştirilen bu tez çalışması kapsamında miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin hedef genleriyle ve ortak olarak hedefledikleri genlerle olan ilişkilerinin incelendiği *in silico* analizler miRNET programı üzerinden ve KEGG veri tabanından yararlanılarak gerçekleştirilmiş, tez kapsamında çalışılan miRNA'ların hedef genleri ve ortak olarak hedefledikleri genler haritalandırılmıştır (Şekil 4.1).

miR-146a-5p'nin transkripsiyon sonrası düzenlemesinde görev aldığı hedef genler arasında bulunan *IRAK1*, *IRAK2*, *TRAF6* ve *SQSTM1* (sequestosome 1 – *SQSTM1*) genleri NF-κB sinyal yolağının ana düzenleyicileridirler. Yine miR-146a-5p'nin hedef genleri arasında bulunan *TLR2*, *TLR4*, *IRF7* ve *MIF* (macrophage migration inhibitory factor – *MIF*) genleri de TLR sinyal yolağının, bağışıklık ve enflamatuvar yanıtlarının düzenleyicileridirler. *LNFG* (lunatic fringe – *LNFG*), *PTGS2* (prostaglandin-endoperoxide synthase 2 – *PTGS2*) ve *TGFB1* (transforming growth factor beta 1 – *TGFB1*) genleri de miR-146a-5p'nin hedeflediği diğer genlerdir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin etkileşim ağında bulunan genler. Genlerin ve miRNA'ların renkleri etkileşim ağına oluşturulduğu miRNET programından bağlantı sayısına göre belirlenmiştir.

NF- κ B hem immün hem de enflamatuar yanıtların önemli bir düzenleyicisidir (Muriel, 2009). TLR aktivasyonu da doğal ve adaptif bağışıklık yanıtlarını ve NF- κ B aracılı olarak proenflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Murakami vd., 2013; O'Reilly, 2018). TLR/NF- κ B sinyal yolağının inhibisyonunun IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proenflamatuar sitokinlerin seviyelerini azaltarak enflamasyonu düşürebileceği görülmüştür (Saba vd., 2014; Taganov vd., 2006; Wang vd., 2019; Zhou vd., 2019). TLR/NF- κ B sinyal yolunun rolünü anlamak, enflamasyon mekanizmaları, immün düzensizlik ve MS hastalığı için potansiyel terapötik hedefler belirlenmesine ve bu sinyal yolağının ve düzenleyicilerinin hedeflenmesi MS ve diğer otoimmün enflamatuar hastalıklar için terapötik ajanların geliştirilmesine fırsat sunabilir (Frans vd., 2014; Muriel, 2009). MS hastalarının ve kontrollerin PBMC örneklerinden elde edilen gen ekspresyonu profillerinin kullanıldığı bir *in silico*  alışmada *PTGS2* geninin MS hastaları ve kontroller arasında farklı düzeylerde ifade edildiği ve ekspresyon düzeyi farklılık gösteren birçok genle etkileşim ağında bulunduğu gösterilmiştir (Shang vd., 2020). Nataf ve arkadaşlarının progresif MS hastalarıyla gerçekleştirdikleri çalışmalarda ise *TGFB1* geni progresif enflamasyonla ve demiyelinizasyonla ilişkili bulunurken, *TGFB1* geninin promotör bölgesinde bulunan polimorfizmler ise RRMS riski ile ilişkili bulunmuş ve hastalığa genetik yatkınlığı arttırdığı bildirilmiştir (Grigorova vd., 2020; Nataf vd., 2017, 2019). miR-146a-5p'nin TLR/NF- κ B sinyal yolağının ana negatif düzenleyicisi rolünde olması ve *in silico* analizler sonucunda MS ile ilişkili olduğu düşünülen *PTGS2* ve *TGFB1* gibi genleri hedeflediğinin görülmesi, bu miRNA'nın MS hastalığında biyobelirteç olabilme potansiyelini göstermektedir.

miR-155-5p'nin transkripsiyon sonrası düzenlemesinde görev aldığı hedef genler arasında bulunan *FGF2* ve *MEF2A* (myocyte enhancer factor 2A – *MEF2A*) nöron ve oligodendrosit farklılaşmasında görev almaktadır. Diğer hedefleri arasında yer alan *MAPK14*, *PIK3R2*, *MYD88*, *JUN* (AP-1 transcription factor subunit – *JUN*), *STIM1* (stromal interaction molecule 1 – *STIM1*) ve *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 – *CTLA4*) immün yanıtları ve immün sistem hücreleri arasındaki iletişimi düzenlemektedir. *STAT3*, *ZFP36* (zinc finger protein 36 – *ZFP36*) ve *CCL2* (C-C motif chemokine ligand 2 – *CCL2*) genleri de enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. *PELI1* (pellino E3 ubiquitin protein ligase 1 –

PELI1), *MUT* (methylmalonyl-CoA mutase – *MUT*), *PCCB* (propionyl-CoA carboxylase subunit beta – *PCCB*), *SIN3A* (*SIN3* transcription regulator family member A – *SIN3A*), *PCCA* (propionyl-CoA carboxylase subunit alpha – *PCCA*), *AGL* (amylo-alpha-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase – *AGL*), *EDN1* (endothelin 1 – *EDN1*) ve *PRKAR1A* (protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha – *PRKAR1A*) genleri de hücreler arası iletişimde, immün ve enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreçte rol alan ve miR-155-5p'nin hedefleri arasında bulunan diğer genler olarak haritalandırılmıştır (Şekil 4.1).

FGF2 geninin MS ile ilişkisinin MS'in hayvan modeli olan EAE'lerde çalışıldığı araştırmalarda *FGF2* gen tedavisi uygulanan farelerin omurilik sıvısında daha az T hücresi ve makrofaj görülürken, 60 günün sonunda tedavi grubunda tedavi uygulanmayanlara göre daha düşük miyelin hasarı ve akson kaybı bulunduğu gösterilmiştir (Ruffini vd., 2001). Buna ek olarak *FGF2*^{-/-} farelerde de daha şiddetli bir hastalık seyri izlenmiş, bu farelerde remiyelinizasyonun ve akson sayısının azaldığı bildirilmiştir (Rottlaender vd., 2011). Elde edilen sonuçlar *FGF2*'nin MS hastalığında nöro koruyucu bir etki gösterdiğini ve MSS'de enflamasyonu azalttığını göstermiştir. İmmün sistem hücreleri arasındaki iletişimin düzenlenmesinde rol aldığı bilinen *MAPK14* ve *MYD88*'in MS gibi otoimmün enflamatuar bir hastalık olan ankilozan spondilit hastalarında kontrollere göre daha yüksek seviyede ifade edildiği bildirilmiştir (Roozbehkia vd., 2017). *STIM1*^{-/-} farelerden alınan T hücrelerinde de sitokin üretiminin bozulduğunun gösterilmesiyle (Oh-hora vd., 2008), araştırmacılar *STIM1*'in otoimmün ve enflamatuar hastalıklarda daha fazla rolünün keşfedilebileceğini düşünmektedir (Feske, 2009). miR-155-5p'nin hedeflediği genlerden bir diğeri T hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen ve T hücresi aktivasyonunun inhibe edilmesinde kritik öneme sahip olan *CTLA4* genidir. Daha önce birçok çalışmada *CTLA4* geninde bulunan SNP'lerin MS hastalığına yakınlıkla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Haibing vd., 2016; Ligiers vd., 1999). *In silico* analizler sonucunda haritalandırılan hedeflerinin remiyelinizasyonda, bağışıklık ve enflamatuar yanıtların düzenlenmesinde rol alması; bazı hedeflerinin astım, ankilozan spondilit gibi otoimmün ve enflamatuar hastalıklarla ilişkilendirilmesi miR-155-5p'nin ve hedeflerinin terapötik potansiyellerinin bir göstergesidir.

miR-196a-5p'nin transkripsiyon sonrası düzenlemesinde görev aldığı hedef genler arasında bulunan *NFKBIA* (NFKB inhibitör alpha – *NFKBIA*) enflamatuar ve immün yanıtların düzenlenmesinde yer alan NF- κ B'nin inhibitörünü kodlamaktadır (Zhang vd., 2015). *NFKBIA* tarafından düzenlenen NF- κ B transkripsiyon faktörünün apoptoz, enflamasyon ve bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesi dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde rol oynaması (Lin vd., 2012), NF- κ B ekspresyonunun düzensizliğinin, otoimmün ve inflammatuar hastalıklarla ilişkilendirilmesine ve MS patogeneğinde potansiyel bir rolü olduğunun düşünülmesine sebep olmaktadır (Ponce vd., 2009). miR-196a-5p'nin hedefleri arasında bulunan hücre sağ kalımı ve çoğalmasında rolü olan *MAPK1*, immün yanıtların düzenlenmesinden de sorumludur ve MS'te karakteristik olan kontrolsüz B hücre çoğalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Kotelnikova vd., 2019).

In silico analizlerle bu tez kapsamında çalışılan miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin etkileşim ağının incelenmesiyle elde edilen dikkat çekici bir diğer sonuç bu miRNA'ların her üçü tarafından da hedeflenen genlerin haritalandırılmasıdır. Şekil 4.1'de de gösterildiği üzere *CCND1* (cyclin D1 – *CCND1*), *CCND2*, *NOTCH2* (Notch receptor 2 – *NOTCH2*) ve *MMP2* genlerinin transkripsiyon sonrası düzenlemesinde her 3 miRNA da görev almaktadır. Literatürdeki çalışmalarda gerçekleştirilen *in silico* zenginleştirme analizlerinde, bitki bazlı bir bileşik türü olan EGCG'nin (epigallocatechin-3-gallate – EGCG) *CCND1*'i hedefleyerek hücre döngüsünü, T hücre reseptör sinyal yolunu, Th hücre farklılaşmasını ve NF- κ B sinyal yolunu etkileyebileceği gösterilmiştir (Niu vd., 2023). Her 3 miRNA tarafından da hedeflenen bir başka gen olan *NOTCH2* genin azalan ekspresyon seviyesi DMT grubu ilaç tedavisi alan MS hastalarında tedaviyi nötralize edici anti-ilac antikör gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Ek olarak, azalan *NOTCH2* ekspresyonu, monositlerin proinflammatuar bir fenotipe doğru yönlenmesiyle de ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, MS hastaların tedaviye yanıtının değerlendirilmesinde ve immünolojik mekanizmaların anlaşılmasında *NOTCH2* genin potansiyel bir hedef olduğu vurgulanmıştır (Adriani vd., 2018). *MMP2* geni ise enflamatuar ve immün yanıtların oluşmasıyla, aksonal hasarla, demiyelinizasyonla ve KBB'nin geçirgenliğinin bozulmasıyla ilişkilendirilmiştir (Bar-Or, 2003; Benešová vd., 2009; Newman, 2001; Nezhad vd., 2024; Zimmer vd., 2018). MS hastalarının monositlerinde *MMP2*

ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür (Bar-Or, 2003). Bu durum monositlerin yüksek *MMP2* ekspresyonuna bağlı bir mekanizmayla MS hastalığında nöroenflamasyonu arttırdığını düşündürmektedir; çünkü KBB bariyeri boyunca monositlerin göçünün TIMP1 tarafından engellendiği bilinmektedir (Séguin vd., 2003). Artan *MMP2* ve diğer *MMP* ailesi üyelerinin ekspresyon seviyeleri monositlerin MSS'ye girişini kolaylaştırmakta ve hastalarda nöroenflamasyonun artmasına sebep olmaktadır (Bar-Or, 2003). Ayrıca başka bir çalışmada *MMP2*'nin sadece monositlerde değil mikroglialarda, makrofajlarda ve astrositlerde de ifade edildiği ve bu sayede serum *MMP2* ekspresyon düzeylerinin artmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada artan serum *MMP2* ekspresyon seviyeleri MS'e bağlı engelliliğin ciddiyetiyle de ilişkili bulunmuş, sadece hastalık patogeneziyle değil, hastalık aktivitesiyle de ilişkilendirilmiştir (Benešová vd., 2009). *MMP2* ve diğer *MMP* üyelerinin MS lezyonlarında ekspresyonunun arttığının bilinmesine ek olarak (Anthony vd., 1997; Maeda & Sobel, 1996) Newman ve arkadaşları, subkortikal beyaz cevhere *MMP2* enjeksiyonu uygulamasının sıçanlarda aksonal hasara yol açtığını göstermiştir (Newman, 2001). RRMS hastalarının BOS'larında ve serumlarında *MMP2* ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve MS hastalığının teşhisi için potansiyel bir biyobelirteç adayı olabileceği bildirilmiştir (Liu vd., 2022). Fiziksel ve bilişsel antrenmanlarla MS hastalarının serum *MMP2* ekspresyon seviyelerinin azaldığının gösterilmesi de *MMP2* ile MS arasındaki ilişkinin vurgulandığı dikkat çekici sonuçlar arasındadır (Nezhad vd., 2024; Zimmer vd., 2018). Gerçekleştirilen *in silico* analizlerde bu tez kapsamında çalışılan miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin hücrel gelişim ve farklılaşmayı, metabolizmayı, göç ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreci düzenleyen farklı ve ortak hedef genlere sahip oldukları görülmüştür (Şekil 4.1).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

MS genç yetişkinlerde travma harici nörolojik engelliliğin en yaygın sebebidir (Dobson & Giovannoni, 2019). Ölümcül olmayan bu hastalık, hastaların yaşam kalitesini ve iş yapabilme kapasitesini ciddi derecede etkilemektedir (Filippi vd., 2018). Etiyolojisinde birçok genetik ve çevresel faktörünün rol aldığı MS'in tedavisinde ikinci basamakta kullanılan ve DMT grubu bir ilaç olan fingolimod, S1P reseptörü modülatörü olarak görev alan, immün-baskılayıcı ve ağızdan alınan bir ajandır (Willis & Cohen, 2013). MS hastalığının teşhisi, takibi ve fiziksel engelliliğin değerlendirilebilmesi için birkaç farklı klinik metot bulunuyor olsa da klinikte hem hastalığın takibine hem de tedavinin etkilerinin değerlendirilmesine yardımcı olacak biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır (Efendi & Yandım Kuşçu, 2018).

miRNA'lar transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde görev almaktadır. (Pasquinelli, 2012). SNP'ler miRNA genlerinde de bulunabilir ve miRNA'ların stabilitelere ve olgun miRNA oluşturma süreçlerine etki ederek ekspresyon seviyelerinde değişikliklere yol açabilirler. Değişen miRNA ekspresyon seviyeleri immün yanıtların ve enflamatuar yanıtların oluşması da dahil olmak üzere birçok fizyolojik fonksiyonun düzenlenmesinde değişikliğe neden olabilir. Bu sebeple miRNA SNP'lerinin ve ekspresyon seviyelerinin MS hastalık riski ile ilişkilerinin ve MS'teki rollerinin araştırılmasının, karmaşık bir etiyolojiye sahip olan MS'in anlaşılmasına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p miRNA'larının dolaşımdaki ekspresyon seviyeleriyle bu miRNA'ların genlerinde bulunan SNP'lerin MS hastalığı riski ile ilişkisini inceleyerek, SNP'lerin miRNA plazma ekspresyon seviyesi üzerindeki etkisinin, SNP'lerin Türk toplumunda MS'e yatkınlıktaki rolünün ve miRNA plazma ekspresyon seviyelerinin MS hastalığının teşhisi ve uygulanan tedavinin etkilerinin gözlemlenebilmesi için biyobelirteç olma potansiyellerinin değerlendirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda, SNP çalışmalarının gerçekleştirildiği Grup-1 ve ekspresyon seviyesi çalışmalarının gerçekleştirildiği Grup-2 olmak üzere iki örnek grubu oluşturulmuştur.

Grup-1'deki RRMS hastalarının klinik bilgileri cinsiyetler arasında karşılaştırıldığında erkek RRMS hastalarının kadın RRMS hastalarına göre daha yüksek EDSS skorlarına ve MSSS değerlerine, daha yüksek serum trigliserit, LDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol düzeylerine sahip olduğu görülmüştür. Ek olarak serum HDL-kolesterol düzeylerinin erkek hastalarda kadın hastalara göre daha düşük olduğu görülmüştür. Bu bulgular, MS hastalığının erkeklerde daha ağır geçtiğinin, daha ağır fonksiyonel kayıplara ve ciddi semptomlara yol açtığı ve erkeklerde MS hastalığının RRMS klinik alt formunun kadınlara göre daha kötü bir prognoza sahip olduğunun bir göstergesidir.

400 RRMS ve 400 kontrol katılımcısından oluşan Grup-1 popülasyonunda *MIR146A* rs2910164 G/C, *MIR155* rs767649 T/A ve *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'lerinin genotipleri belirlenmiş ve farklı genotip modellerine göre bu SNP'lerin RRMS riski ile ilişkisi incelenmiştir. Türk toplumunda MS hastalığında ilk kez bu tez kapsamında çalışılan *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin T alel frekansının RRMS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.018$). Dominant modele göre gerçekleştirilen karşılaştırma sonuçlarına göre de minör T aleli taşıyıcısı olmanın RRMS riski ile ilişkili olduğu görülmüştür ($OR=1.51$, $P=.005$). OR ve P değerleri yaşa ve cinsiyete göre düzenlenerek yeniden hesaplandığında dominant modele göre TT+CT genotipinin RRMS riskiyle 1.51 kat ilişkili olduğu görülmektedir ($P=.005$). İkili lojistik regresyon analizlerinde rs11614913 CT genotipi hastalık riskiyle 1.52 kat ilişkili bulunmuştur ($P=.008$). Bu sonuçlara göre rs11614913 C/T SNP'sinin T aleli Türk toplumunda RRMS riskiyle istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur ($P=.018$). Bu miRNA SNP'lerinin ikili ve üçlü kombinasyonları ile gerçekleştirilen analizlerde sırasıyla rs2910164 G/C SNP'sinin GG ve rs767649 T/A SNP'sinin TT genotiplerinin (GGTT: $P=.007$) ve rs2910164 G/C SNP'sinin GG ve rs11614913 C/T SNP'sinin CC genotiplerinin (GGCC: $P=.008$) ikili kombinasyonlarına sahip bireylerin kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla sayıda olduğu görülmüştür. Buna karşılık rs767649 T/A SNP'sinin TA ve rs11614913 C/T SNP'sinin CT genotiplerinin (TACT: $P<.001$) ikili kombinasyonuna ve rs2910164 G/C SNP'sinin GG, rs767649 T/A SNP'sinin TA ve rs11614913 C/T SNP'sinin CT genotiplerinin (GGTACT: $P=.003$) üçlü kombinasyonuna sahip bireylerin RRMS grubunda anlamlı derecede daha fazla sayıda olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar farklı miRNA SNP varyantlarının bir aradayken

hastalık riskiyle veya hastalığa karşı koruyucu bir rol ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında incelenen *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin genotiplerinin ve farklı genotip modellerinin klinik parametrelerle bir aradayken orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ve hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkileri ikili lojistik regresyon analizleri ile incelenmiştir. Bu analizlerde hastalık süresinin (OR=1.23) ve tedavi süresinin (OR=1.24) orta düzey EDSS riski ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Ek olarak, VLDL-kolesterol, hastalık süresiyle (OR=2.13) ve tedavi süresiyle (OR=2.40) birlikte orta düzey EDSS riski (EDSS>3) ile ilişkili bulunmuştur. Hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili parametrelerin incelenmesi için gerçekleştirilen ikili regresyon analizlerinde rs2910164 SNP'sinin GC veya CC genotipine sahip olma durumu farklı modellerde hızlı MS progresyon riski ile ilişkili bulunmuştur (Model 5: OR=1.83; Model 6: OR=1.19) (Çizelge 3.20). Bu durum *MIR146A* rs2910164 G/C SNP'sinin MS riskiyle ilişkili olmasa da hastalık progresyonuyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Serum trigliserit düzeyleri hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile 1.18 kat ilişkili bulunmuştur. Benzer şekilde serum VLDL-kolesterol düzeyleri de miRNA SNP'lerinin kodominant (OR=2.51) ve dominant (OR=2.50) modellerinde hızlı MS progresyon riski (MSSS>5) ile ilişkili bulunmuştur. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, MS hastalarının serum lipit düzeylerinin, hastalık ve tedavi süresi gibi klinik parametrelerle birlikte incelenerek, MS'e bağlı engelliliğin ve hastalığın seyrinin takibinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında Grup-2'deki naif RRMS, fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarında plazma miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri belirlenmiş ve bu miRNA'ların dolaşımdaki rölatif ekspresyon seviyelerinin hastalıkla ilişkisi incelenmiştir. Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS ($P<.001$) ve kontrol ($P<.001$) gruplarına göre anlamlı derecede daha düşük olduğu görülmüştür. Hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılarak gerçekleştirilen ikili lojistik regresyon analizlerinde de plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin azalması fingolimod tedavisi alan RRMS hastası olma riskiyle anlamlı derecede ilişkili bulunmuştur (OR=0.013, $P=.001$). Gerçekleştirilen ROC analizlerine göre de plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS hastalarının ve kontrol

gruplarının sınıflandırılması için zayıf derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür ($AUC=0.691$, $P=.01$). Ayrıca, plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin tedavi alan RRMS ve naif RRMS hastalarının sınıflandırılması için iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülürken ($AUC=0.890$, $P<.001$), fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için çok iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür ($AUC=0.923$, $P<.001$). Literatürdeki çalışmalarda da DMT grubu ilaçlardan olan natalizumab ve dimetil fumarat tedavisi alan RRMS'li hastalarda tedaviye başladıktan sonra miR-155-5p ekspresyon seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (Giuliani vd., 2021; Mameli vd., 2016; Mohammed, 2018). Bu sonuçlar miR-155-5p'nin fingolimod tedavisi için potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Fingolimod tedavisi ile miR-155-5p arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde incelenmesi, miR-155-5p'nin fingolimod tedavisinin hedefi olup olmadığının değerlendirilebilmesi için; boylamsal çalışmaların gerçekleştirilmesi ise miR-155-5p'nin tedavi yanıtının değerlendirilmesindeki potansiyelinin ölçülmesi için önemlidir. Bu sonuçlara ek olarak fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile serum 25-(OH) D₃ düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür ($r=0.521$, $P=.004$). Bu durum eksikliği MS için bir risk faktörü olarak belirlenen D vitamini ile immün ve enflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde rolü olan miR-155-5p'nin arasında potansiyel bir etkileşim olduğunu göstermektedir. Serum 25-(OH) D₃ düzeyleri ve miR-155-5p ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin altında yatan mekanizmaların ve çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçler üzerindeki birleşik etkilerinin anlaşılması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Grup-2'deki fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin, naif RRMS grubunun plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu görülmüştür ($P=.02$). Hasta ve kontrol grupları ikili olarak gruplandırılarak gerçekleştirilen ikili lojistik regresyon analizlerinde plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi naif RRMS hastası olma veya tedavi alma durumuyla ilişkili bulunmamış olsa da gruplar arası karşılaştırma analizlerinde hasta ve kontrol grupları arasında plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldüğü için ROC analizleri gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ROC analizlerine göre plazma miR-196-5p rölatif ekspresyon

seviyelerinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve naif RRMS hastalarının sınıflandırılması için orta derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.715, $P=.005$). MS hastalarında tedaviyle ilişkisi daha önce hiç çalışılmamış olan miR-196a-5p'nin dolaşımdaki ekspresyon seviyelerinin de MS hastalığındaki rolüne dair örnek bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında ilk kez dolaşımdaki miR-196a-5p ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisiyle olan ilişkisi çalışılmıştır. Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin naif RRMS grubuna göre daha düşük olması, immün sistem ve enflamatuar yanıtlar üzerinden etkinlik gösteren fingolimod tedavisi ile miR-196a-5p ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Fingolimod tedavisi ile değişen plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesi hakkında daha kapsamlı sonuçlara ulaşılması ve fingolimod tedavisinin moleküler işleyişinde bu miRNA'nın rolünün anlaşılması için gelecek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sonuçlara ek olarak fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile serum total kolesterol ($\rho=393$, $P=.04$) ve LDL-kolesterol ($\rho=440$, $P=.02$) düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür. miR-196a-5p'nin öncül yağ dokusu hücrelerinin çoğalması ve olgun yağ dokusu hücrelerine farklılaşması olan adipogenezde düzenleyici rolü olduğu bilinen *HOXC8* ve *SFMBT1* genlerini hedeflemesi, lipid metabolizmasıyla arasındaki potansiyel ilişkiyi ve korelasyon analizlerinde elde edilen sonuçları desteklemektedir (Ghanbari vd., 2015). miR-196a-5p'nin adipogenezdeki görevleri, serum kolesterol ve trigliserit değişimlerinin hastalığın progresyonuyla ve engellilik skorlarıyla ilişkili olduğunu göstermesiyle birlikte ele alındığında, bu miRNA'nın lipid metabolizmasındaki görevleriyle de hastalığın progresyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında incelenen miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin hedef genleriyle ve ortak olarak hedefledikleri genlerle olan ilişkilerinin incelendiği *in silico* analizler miRNET programı üzerinden ve KEGG veri tabanından yararlanılarak gerçekleştirilmiş, tez kapsamında çalışılan miRNA'ların hedef genleri ve ortak olarak hedefledikleri genler haritalandırılmıştır. miR-146a-5p'nin TLR/NF- κ B sinyal yolağının ana negatif düzenleyicisi rolünde olması ve *in silico* analizler sonucunda MS ile ilişkili olduğu düşünülen *PTGS2* ve *TGFB1* gibi genleri hedeflediğinin görülmesi, bu miRNA'nın MS hastalığının patogenezinde tek bir yolak üzerinden değil karmaşık

birçok biyolojik süreçte rol aldığını göstermektedir. Benzer şekilde miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin de hedeflerinin remiyelinizasyonda, bağışıklık ve enflamatuvar yanıtların düzenlenmesinde rol alması ve bazı hedeflerinin astım ve ankilozan spondilit gibi otoimmün ve enflamatuvar hastalıklarla ilişkilendirilmesi; bu miRNA'ların MS patagonezinde farklı şekillerde rol aldıklarının ve hedeflerinin terapötik potansiyellere sahip olduğunun bir göstergesidir. *In silico* analizlerle bu tez kapsamında çalışılan miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin etkileşim ağının incelenmesiyle elde edilen dikkat çekici bir diğer sonuç bu miRNA'ların hücreyel gelişim ve farklılaşmayı, metabolizmayı, göç ve apoptoz gibi birçok biyolojik süreci düzenleyen ortak hedef genlere sahip olduklarının görülmesidir. Tek tek ve bir arada düşünüldüklerinde, bu miRNA'ların MS'in patogenezi ve progresyonu için kritik olabilecek hedeflere sahip olmaları miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p'nin ve hedeflerinin MS hastalığında terapötik birer hedef olabileceğini göstermektedir. Bu miRNA'ların MS hastalığıyla ve MS hastalığının tedavisinde kullanılan tedavi ajanlarıyla ilişkilerinin moleküler ve boylamsal çalışmalarla incelenmesinin, bu miRNA'ların hastalığın patogenezindeki rollerinin ve ekspresyon seviyeleri üzerine tedavi ajanlarının etkilerinin anlaşılması için daha kapsamlı sonuçların elde edilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen önemli sonuçlar aşağıda özet olarak sunulmuşlardır:

- *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin T alel frekansının RRMS grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.018$).
- Dominant modele göre gerçekleştirilen karşılaştırma sonuçlarına göre *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin TT+CT genotipine sahip olmanın RRMS riski ile ilişkili olduğu görülmüştür ($OR=1.51$, $P=.005$).
- OR ve P değerleri yaşa ve cinsiyete göre düzenlenerek yeniden hesaplandığında da dominant modele göre *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin TT+CT genotipine sahip olmanın RRMS riskiyle ilişkili olduğu görülmüştür ($OR:1.51$, $P=.005$).
- İkili lojistik regresyon analizlerine göre, *MIR196A2* rs11614913 C/T SNP'sinin CT genotipi RRMS riski ile ilişkilidir ($OR=1.52$, $P=.008$).
- İkili lojistik regresyon analizlerinde rs2910164 SNP'sinin GC veya CC genotipine sahip olma durumu farklı modellerde hızlı MS progresyon riski

(MSSS>5) ile ilişkili bulunmuştur (Model 5: OR=1.83, $P=0.047$; Model 6: OR=1.19, $P=0.049$).

- Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-146a-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle plazma miR-155-5p ($\rho=596$, $P=0.001$) ve miR-196a-5p ($\rho=527$, $P=0.003$) seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür.
- Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, naif RRMS ve kontrol grubuna göre daha düşüktür (Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P<0.001$; Fingolimod alan RRMS-Kontrol: $P<0.001$).
- Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle plazma miR-146-5p ($\rho=596$, $P=0.001$) ve miR-196a-5p ($\rho=556$, $P=0.002$) seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür.
- Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile serum 25-(OH) D₃ düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür ($\rho=521$, $P=0.004$).
- İkili lojistik regresyon analizlerine göre, plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin azalmasıyla tedavi alan RRMS olma durumu anlamlı derecede ilişkilidir (OR=0.013 $P=0.001$).
- Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin naif RRMS hastalarının ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için zayıf derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.691, $P=0.01$).
- Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin tedavi alan RRMS ve naif RRMS hastalarının sınıflandırılması için iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.890, $P<0.001$).
- Plazma miR-155-5p rölatif ekspresyon seviyesinin fingolimod tedavisi alan RRMS ve kontrol gruplarının sınıflandırılması için çok iyi derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür (AUC=0.923, $P<0.001$).
- Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, naif RRMS grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşüktür (Fingolimod alan RRMS-Naif RRMS: $P=0.02$).

- Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleriyle plazma miR-146-5p ($\rho=527$, $P=.003$) ve miR-155-5p ($\rho=556$, $P=.002$) seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmüştür.
- Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyeleri ile serum total kolesterol ($\rho=393$, $P=.04$) ve LDL-kolesterol ($\rho=440$, $P=.02$) düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon görülmüştür.
- Plazma miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyesinin tedavi alan RRMS ve naif RRMS hastalarının sınıflandırılması için orta derecede bir ayırıcı potansiyelinin olduğu görülmüştür ($AUC=0.715$, $P=.005$).
- Erkek RRMS hastalarının kadın RRMS hastalarına göre daha yüksek EDSS skoruna ($P=.01$), daha fazla sayıda orta düzey EDSS riskine ($EDSS>3$) sahip hastaya ($P=.01$) ve daha yüksek MSSS değerlerine ($P=.009$) sahip olduğu görülmüştür.
- Erkek RRMS hastalarında serum trigliserit ($P<.001$), LDL-kolesterol ($P=.01$) ve VLDL-kolesterol ($P<.001$) düzeylerinin kadın RRMS hastalarından yüksek; serum HDL-kolesterol ($P<.001$) düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür.
- Fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarının EDSS skorlarının, naif RRMS hastalarının EDSS skorlarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.001$).
- Serum trigliserit düzeylerinin fingolimod tedavisi alan RRMS grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür ($P=.009$).
- Serum 25-(OH) D₃ düzeylerinin naif RRMS hastalarında, fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür ($P=.002$).
- Fingolimod tedavisi alan RRMS grubunun hem T1 ($P<.001$) hem de T2 ($P<.001$) lezyon sayılarının, naif RRMS grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu görülmüştür.
- Kontrast tutan lezyona sahip birey sayısının naif RRMS grubunda, fingolimod tedavisi alan RRMS grubundan istatistiksel olarak fazla olduğu görülmüştür ($P<.001$).

- VLDL-kolesterol düzeylerinin EDSS skorları ($\rho=.248$, $P<.001$) ve MSSS değerleri ile ($\rho=.185$, $P<.001$) pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur.
- Hastalık süresinin ($OR=1.23$, $P<.001$) ve tedavi süresinin ($OR=1.24$, $P<.001$) orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) ile ilişkili olduğu bulunmuştur.
- VLDL-kolesterol, hastalık ($OR=2.13$, $P=.03$) ve tedavi süresiyle ($OR=2.40$, $P=.01$) birlikteken orta düzey EDSS riski ($EDSS>3$) ile ilişkili bulunmuştur.
- VLDL-kolesterol miRNA SNP'lerinin kodominant ($OR=2.51$, $P=.002$) ve dominant ($OR=2.50$, $P=.002$) modellerinin bulunduğu ikili lojistik regresyon modellerinde hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) ile ilişkili bulunmuştur.
- Serum trigliserit düzeyleri hızlı MS progresyon riski ($MSSS>5$) ile ilişkili bulunmuştur ($OR=1.18$, $P=.04$).

Bu tez çalışmasıyla, enflamatuvar ve bağışıklık yanıtlarının oluşmasıyla ilişkili olan miR-146a-5p, miR-155-5p ve miR-196a-5p miRNA'larının dolaşımdaki ekspresyon seviyeleriyle bu miRNA'ların genlerinde bulunan SNP'lerin (rs2910164, rs767649, rs11614913) MS hastalığı riski ile ilişkisi incelenmiş, bu SNP'lerin miRNA plazma ekspresyon seviyesi üzerindeki etkileri ve Türk toplumunda MS'e yatkınlıktaki rolleri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Ayrıca miRNA plazma ekspresyon seviyelerinin MS hastalığının teşhisi ve uygulanan tedavinin etkilerinin gözlemlenebilmesi için biyobelirteç olma potansiyelleri de değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasıyla ilk defa Türk toplumunda *MIR146A* rs2910164, *MIR155* rs767649 ve *MIR196A2* rs11614913 SNP'lerinin RRMS hastalığı riskiyle ilişkisi incelenmiş; daha önce MS ile ilişkisi hiç çalışılmamış olan *MIR196A2* rs11614913 SNP'sinin polimorfik T alelinin Türk toplumunda MS hastalığı için bir risk faktörü olduğu ortaya konmuştur. Bu SNP'nin ürünü olan miR-196a-5p'nin ekspresyon seviyesi üzerindeki etkilerinin ve miR-196a-5p'nin MS hastalığının patogenezinde ve progresyonundaki rolünün anlaşılması için moleküler düzeyde fonksiyonel çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında miRNA SNP'leriyle birlikte plazma miRNA ekspresyon seviyeleri de incelenmiş, plazma miR-155-5p ve miR-196a-5p rölatif ekspresyon seviyelerinin fingolimod tedavisi alan RRMS hastalarında, naif RRMS hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu görülmüştür. Bu miRNA'ların fingolimod tedavi ajanının terapötik bir hedefinin olup olmadığının anlaşılması için moleküler düzeyde; tedavi yanıtının değerlendirilmesindeki

potansiyellerinin ölçülmesi için de boylamsal çalışmaların gerçekleştirilmesi önerilmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara dair gerçekleştirilecek daha kapsamlı çalışmalarla birlikte, miRNA SNP taşıyıcıları daha genç yaşlarda, henüz MS teşhisi almadan takip edilebilir, bu SNP taşıyıcılarında MS hastalığının gelişimi yavaşlatılabilir ve bu kişiler MS teşhisi aldıklarında hastalığın prognozunu hafifletmek için kişiselleştirilmiş önlemler alınabilir. Plazmadaki potansiyel biyobelirteç adaylarını ortaya koyan bu çalışmadan elde edilen sonuçlardan yola çıkarak henüz kesin bir tedavisi bulunmayan MS hastalığı için dolaşımdaki miRNA'ları hedefleyen terapötik ajanlar geliştirilebilir; boylamsal çalışmalardan elde edilecek sonuçlarla hem MS hastalığının progresyonunun hem de tedavi yanıtlarının takibi için biyoalgılayıcılar geliştirilebilir. Multidisipliner bir yaklaşımın benimsendiği bu tez çalışması, ulaşılan dikkat çekici sonuçlarıyla Biyomedikal Mühendisliği alanına önemli katkılarda bulunmuş bir çalışma olarak nitelendirilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelaleem, O., & Shaker, O.** (2021). MiR-146a and miR-155 polymorphisms in Egyptian patients with Behcet's disease. *Archives of Medical Science*. <https://doi.org/10.5114/aoms/105349>
- Abdi, H.** (2010). Partial least squares regression and projection on latent structure regression (PLS Regression). *WIREs Computational Statistics*, 2(1), 97-106. <https://doi.org/10.1002/wics.51>
- Abo-Elmatty, D. M., & Mehanna, E. T.** (2019). MIR146A rs2910164 (G/C) Polymorphism is Associated with Incidence of Preeclampsia in Gestational Diabetes Patients. *Biochemical Genetics*, 57(2), 222-233. <https://doi.org/10.1007/s10528-018-9886-1>
- Adachi, K., Kohara, T., Nakao, N., Afit, M., Chiba, K., Mishina, T., Sasaki, S., & Fujita, T.** (1995). Design, Synthesis, And Structure-Activity Relationships Of 2-Substituted-2-Amino-1,3-Propanediols: Discovery Of A Novel Immunosuppressant, Fty720. İçinde *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* (C. 5, Sayı 8).
- Adriani, M., Nytrova, P., Mbogning, C., Hässler, S., Medek, K., Jensen, P. E. H., Creeke, P., Warnke, C., Ingenhoven, K., Hemmer, B., Sievers, C., Lindberg Gasser, R. L. P., Fissolo, N., Deisenhammer, F., Bocskei, Z., Mikol, V., Fogdell-Hahn, A., Kubala Havrdova, E., Broët, P., & Jury, E. C.** (2018). Monocyte NOTCH2 expression predicts IFN- β immunogenicity in multiple sclerosis patients. *JCI Insight*, 3(11). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.99274>
- Aggarwal, R., & Ranganathan, P.** (2016). Common pitfalls in statistical analysis: The use of correlation techniques. *Perspectives in clinical research*, 7(4), 187–190. <https://doi.org/10.4103/2229-3485.192046>
- Ahmad, M., & Shah, A. A.** (2020). Predictive Role of Single Nucleotide Polymorphism (Rs11614913) in the Development of Breast Cancer in Pakistani

Population. *Personalized Medicine*, 17(3), 213-227. <https://doi.org/10.2217/pme-2019-0086>

Ahmadi, K., Soleimani, A., Soleimani Motlagh, S., Baharvand Ahmadi, S., Almasian, M., & Kiani, A. A. (2020). Polymorphisms of Pre-miR-499 rs3746444 T/C and Pre-miR-146a rs2910164 C/G in the Autoimmune Diseases of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus in the West of Iran. *Iranian journal of public health*, 49(4), 782-790.

Akdemir, N., Terzi, M., Arslan, N., & Onar, M. (2017). Prevalence of multiple sclerosis in the middle black sea region of Turkey and demographic characteristics of patients. *Noropsikiyatri Arsivi*, 54(1), 11-14. <https://doi.org/10.5152/npa.2016.12451>

Akkız, H., Bayram, S., Bekar, A., Akgöllü, E., & Ülger, Y. (2011). A functional polymorphism in pre-microRNA-196a-2 contributes to the susceptibility of hepatocellular carcinoma in a Turkish population: a case-control study. *Journal of Viral Hepatitis*, 18(7). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01414.x>

Akkız, H., Bayram, S., Bekar, A., Akgöllü, E., Üsküdar, O., & Sandıkçı, M. (2011). No association of pre-microRNA-146a rs2910164 polymorphism and risk of hepatocellular carcinoma development in Turkish population: A case-control study. *Gene*, 486(1-2), 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.07.006>

Alemán-Ávila, I., Jiménez-Morales, M., Beltrán-Ramírez, O., Elda Barbosa-Cobos, R., Jiménez-Morales, S., Sánchez-Muñoz, F., Valencia-Pacheco, G., Amezcua-Guerra, L. M., Juárez-Vicuña, Y., Milagro Razo-Blanco Hernández, D., Concepción Aguilera-Cartas, M., López-Villanueva, R. F., Peralta-Zaragoza, O., Tovilla-Zárate, C., & Ramírez-Bello, J. (2017). Functional polymorphisms in pre-miR146a and pre-miR499 are associated with systemic lupus erythematosus but not with rheumatoid arthritis or Graves' disease in Mexican patients (C. 8, Sayı 54). www.impactjournals.com/oncotarget

- Alfredsson, L., & Olsson, T.** (2019). Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 9(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028944>
- Ali, H. M., Ellakwa, D. E., Elaraby, N. M., Zaher, A. M., & Amr, K. S.** (2023). Study the association of microRNA polymorphisms (miR-146a, miR-4513) with the risk of coronary heart diseases in Egyptian population. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(3). <https://doi.org/10.1002/jbt.23284>
- Ali, M., Shaker, O., Eid, H., Mahmoud, E., Ezzat, E., & Gaber, S.** (2020). Relationship between miR-155 and miR-146a polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis in an Egyptian cohort. *Biomedical Reports*. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1286>
- Ali, O., & Mohammed, B.** (2024). Impact of miR-155 Gene Polymorphism (rs767649 A>T) and miR-155 Gene Expression on Susceptibility to Multiple Sclerosis. *Al-Anbar Medical Journal*, 0(0), 0-0. <https://doi.org/10.33091/amj.2024.144844.1454>
- Ali, Y., Chen, Y., Islam, Z. U., Aman, A., Almutairi, M. M., Alouffi, A., Mohammed, A., Shah, A. A., Rehman, Z. U., Hussain, I., Ali, A., & Jalil, F.** (2023). MIR149 rs2292832 and MIR499 rs3746444 Genetic Variants Associated with the Risk of Rheumatoid Arthritis. *Genes*, 14(2), 431. <https://doi.org/10.3390/genes14020431>
- Alipoor, B., Ghaedi, H., Meshkani, R., Omrani, M. D., Sharifi, Z., & Golmohammadi, T.** (2018). The rs2910164 variant is associated with reduced miR-146a expression but not cytokine levels in patients with type 2 diabetes. *Journal of Endocrinological Investigation*, 41(5), 557-566. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0766-z>
- Alsaedi, E. Q., Alsaedi, M. Q., & Mansuri, F. A.** (2022). Clinical Profile and the Extent of Disability in Multiple Sclerosis Patients in Madinah, Saudi Arabia. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.25851>

- Al-Temaimi, R., Alshammari, N., & Alroughani, R.** (2024). Analysis of potential microRNA biomarkers for multiple sclerosis. *Experimental and Molecular Pathology*, 137, 104903. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2024.104903>
- Anthony, D. C., Ferguson, B., Matyzak, M. K., Miller, K. M., Esiri, M. M., & Perry, V. H.** (1997). Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 23(5), 406-415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1997.tb01315.x>
- Ashida, S., Kondo, T., Fujii, C., Hamatani, M., Mizuno, T., & Ochi, H.** (2022). Association of cerebrospinal inflammatory profile with radiological features in newly diagnosed treatment-naïve patients with multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1012857>
- Assmann, T. S., Duarte, G. C. K., Brondani, L. A., de Freitas, P. H. O., Martins, É. M., Canani, L. H., & Crispim, D.** (2017). Polymorphisms in genes encoding miR-155 and miR-146a are associated with protection to type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 54(5), 433-441. <https://doi.org/10.1007/s00592-016-0961-y>
- Backes, C., Meese, E., & Keller, A.** (2016). Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 20(6), 509-518. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0221-4>
- Balkan, E., & Bilge, N.** (2021). Expression levels of IL-17/IL-23 cytokine-targeting microRNAs 20, 21, 26, 155, and Let-7 in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurological Research*, 43(9), 778-783. <https://doi.org/10.1080/01616412.2021.1935099>
- Bar-Or, A.** (2003). Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain*, 126(12), 2738-2749. <https://doi.org/10.1093/brain/awg285>
- Baulina, N., Kulakova, O., Kiselev, I., Osmak, G., Popova, E., Boyko, A., & Favorova, O.** (2018). Immune-related miRNA expression patterns in peripheral blood mononuclear cells differ in multiple sclerosis relapse and remission. *Journal of Neuroimmunology*, 317, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.01.005>

- Becklund, B. R., Severson, K. S., Vang, S. V., & DeLuca, H. F.** (2010). UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6418-6423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001119107>
- Benešová, Y., Vašků, A., Novotná, H., Litzman, J., Štourač, P., Beránek, M., Kadaňka, Z., & Bednařík, J.** (2009). Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 15(3), 316-322. <https://doi.org/10.1177/1352458508099482>
- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A.** (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, 375(6578), 296-301. <https://doi.org/10.1126/science.abj8222>
- Bogunia-Kubik, K., Wysoczańska, B., Piątek, D., Iwaszko, M., Ciechomska, M., & Świerkot, J.** (2016). Significance of Polymorphism and Expression of miR-146a and NFkB1 Genetic Variants in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 64(S1), 131-136. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0443-5>
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., Sun, G., Tay, J., Linsley, P. S., & Baltimore, D.** (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1189-1201. <https://doi.org/10.1084/jem.20101823>
- Bonneau, E., Neveu, B., Kostantin, B., Tsongalis, G., & De Guire, V.** (2019). *How close are miRNAs from clinical practice? A perspective on the diagnostic and therapeutic market.*
- Boshra, H., Awad, M., Hussein, M., & Elyamani, E.** (2022). Vascular dysfunction and dyslipidemia in multiple sclerosis: are they correlated with disease duration

- and disability status? *The Egyptian Heart Journal*, 74(1), 9.
<https://doi.org/10.1186/s43044-022-00244-2>
- Bölük, C., Börü, Ü. T., Taşdemir, M., & Gezer, T.** (2021). Epidemiology of multiple sclerosis in turkey; a ten-year trend in rural cities. *Turk Noroloji Dergisi*, 27(1), 41-45. <https://doi.org/10.4274/tnd.2020.36418>
- Börü, Ü. T., Alp, R., Sur, H., & Gül, L.** (2006). Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey. *Neuroepidemiology*, 27(1), 17-21. <https://doi.org/10.1159/000093895>
- Börü, Ü. T., Bilgiç, A. B., Toksoy, C. K., Yılmaz, A. Y., Tasdemir, M., Sensöz, N. P., Öztop Çakmak, Ö., Duman, A., & Bölük, C.** (2018). Prevalence of multiple sclerosis in a Turkish city bordering an iron and steel factory. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*, 14(2), 234-241. <https://doi.org/10.3988/jcn.2018.14.2.234>
- Brinkmann, V.** (2007). Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics* (C. 115, Sayı 1, ss. 84-105). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.006>
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., & Burtin, P.** (2010). Fingolimod (FTY720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* (C. 9, Sayı 11, ss. 883-897). <https://doi.org/10.1038/nrd3248>
- Can Demirdöğen, B., Öztürk Başer, T., Köylü, M. T., Özge, G., Gürbüz Köz, Ö., & Mumcuoğlu, T.** (2023). Circulating miRNAs and their functional genetic variants in pseudoexfoliative glaucoma: potential of miR-146a-5p as a diagnostic biomarker. *International Ophthalmology*, 43(11), 3953-3967. <https://doi.org/10.1007/s10792-023-02797-w>
- Can Demirdöğen, B., Kiliç, O. O., Yılmaz, A. A., Mungan, S., Neşelioğlu, S., & Erel, Ö.** (2023). Neurocognitive impairment in multiple sclerosis and its association with thiol-disulfide homeostasis and ischemia-modified albumin. *Journal of Neuroscience Research*, 101(4), 508-523. <https://doi.org/10.1002/jnr.25163>

- Canto, E., Tintore, M., Villar, L. M., Costa, C., Nurtdinov, R., Alvarez-Cermenó, J. C., Arrambide, G., Reverter, F., Deisenhammer, F., Hegen, H., Khademi, M., Olsson, T., Tumani, H., Rodríguez-Martin, E., Piehl, F., Bartos, A., Zimova, D., Kotoucova, J., Kuhle, J., & Comabella, M.** (2015). Chitinase 3-like 1: Prognostic biomarker in clinically isolated syndromes. *Brain*, 138(4), 918-931. <https://doi.org/10.1093/brain/awv017>
- Cardoso, A. L., Guedes, J. R., Pereira de Almeida, L., & Pedroso de Lima, M. C.** (2012). miR-155 modulates microglia-mediated immune response by down-regulating SOCS-1 and promoting cytokine and nitric oxide production. *Immunology*, 135(1), 73-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03514.x>
- Casanova, I., Domínguez-Mozo, M. I., De Torres, L., Aladro-Benito, Y., García-Martínez, Á., Gómez, P., Abellán, S., De Antonio, E., & Álvarez-Lafuente, R.** (2023). MicroRNAs Associated with Disability Progression and Clinical Activity in Multiple Sclerosis Patients Treated with Glatiramer Acetate. *Biomedicines*, 11(10), 2760. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11102760>
- Chakrabarti, A., & Ghosh, J. K.** (2011). AIC, BIC and recent advances in model selection. *Philosophy of statistics*, 583-605.
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., & Lee, S. S.** (2021). Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *Journal of Advanced Research* (C. 28, ss. 127-138). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.012>
- Chassin, C., Kocur, M., Pott, J., Duerr, C. U., Gütle, D., Lotz, M., & Hornef, M. W.** (2010). MiR-146a mediates protective innate immune tolerance in the neonate intestine. *Cell Host and Microbe*, 8(4), 358-368. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.09.005>
- Chatzikyriakidou, A., Voulgari, P. V., Georgiou, I., & Drosos, A. A.** (2010). A polymorphism in the 3'-UTR of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK1), a target gene of miR-146a, is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Joint Bone Spine*, 77(5), 411-413. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2010.05.013>

- Chen, C. J., Zhang, Y., Zhang, L., Weakley, S. M., & Yao, Q.** (2011). MicroRNA-196: Critical roles and clinical applications in development and cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(1), 14-23. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01219.x>
- Chiappetta, G., Avantaggiato, V., Visconti, R., Fedele, M., Battista, S., Trapasso, F., Merciai, B. M., Fidanza, V., Giancotti, V., Santoro, M., Simeone, A., & Fusco, A.** (1996). High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene*, 13(11), 2439-2446.
- Coelho, R. P., Payne, S. G., Bittman, R., Spiegel, S., & Sato-Bigbee, C.** (2007). The immunomodulator FTY720 has a direct cytoprotective effect in oligodendrocyte progenitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(2), 626-635. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.123927>
- Coyle, P. K.** (2021). What Can We Learn from Sex Differences in MS? *Journal of Personalized Medicine*, 11(10), 1006. <https://doi.org/10.3390/jpm11101006>
- Curtale, G., Citarella, F., Carissimi, C., Goldoni, M., Carucci, N., Fulci, V., Franceschini, D., Meloni, F., Barnaba, V., & Macino, G.** (2010). An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. <https://doi.org/10.1182/blood-2009>
- Çelik, Y., Birgili, Ö., Kiyat, A., Güldiken, B., Özkan, H., Yilmaz, H., Saip, S., Kuşçu, D., Süttaş, N., Ağaoğlu, J., Utku, U., & Siva, A.** (2011). Prevalence of multiple sclerosis in the metropolitan area of Edirne city, Turkey. *Balkan Medical Journal*, 28(2), 193-196. <https://doi.org/10.5174/tutfd.2010.04089.0>
- De Martino, I., Visone, R., Fedele, M., Petrocca, F., Palmieri, D., Hoyos, J. M., Forzati, F., Croce, C. M., & Fusco, A.** (2009). Regulation of microRNA expression by HMGA1 proteins. *Oncogene*, 28(11), 1432-1442. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.495>
- Demir, S.** (2022). Expanded Disability Status Scale (EDSS) in Multiple Sclerosis. *Cam and Sakura Medical Journal*, 2(3), 82-89. <https://doi.org/10.4274/csmedj.galenos.2022.2022-11-11>

- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A.** (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545-558. <https://doi.org/10.1038/nri3871>
- Deng, N., Zhou, H., Fan, H., & Yuan, Y.** (2017). Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*, 8(66), 110635-110649. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22372>
- Derfuss, T., Bergvall, N. K., Sfikas, N., & Tomic, D. L.** (2015). Efficacy of fingolimod in patients with highly active relapsing–remitting multiple sclerosis. *Current Medical Research and Opinion*, 31(9), 1687-1691. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1067191>
- Dezfuli, N. K., Adcock, I. M., Alipoor, S. D., Seyfi, S., Salimi, B., Mafi Golchin, M., Dalil Roofchayee, N., Varhram, M., & Mortaz, E.** (2020). The miR-146a SNP Rs2910164 and miR-155 SNP rs767649 Are Risk Factors for Non-Small Cell Lung Cancer in the Iranian Population. *Canadian Respiratory Journal*, 2020, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2020/8179415>
- Dobson, R., & Giovannoni, G.** (2019). Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology* (C. 26, Sayı 1, ss. 27-40). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Dominguez-Mozo, M. I., Casanova, I., De Torres, L., Aladro-Benito, Y., Perez-Perez, S., Garcia-Martínez, A., Gomez, P., Abellan, S., De Antonio, E., Lopez-De-Silanes, C., & Alvarez-Lafuente, R.** (2022). microRNA Expression and Its Association With Disability and Brain Atrophy in Multiple Sclerosis Patients Treated With Glatiramer Acetate. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.904683>
- Du, C., Liu, C., Kang, J., Zhao, G., Ye, Z., Huang, S., Li, Z., Wu, Z., & Pei, G.** (2009). MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nature Immunology*, 10(12), 1252-1259. <https://doi.org/10.1038/ni.1798>
- Ďurfinová, M., Procházková, L., Petrleničová, D., Bystrická, Z., Orešanská, K., Kuračka, L., & Líška, B.** (2018). Cholesterol level correlate with disability score

- in patients with relapsing-remitting form of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters*, 687, 304-307. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.10.030>
- Ebrahimkhani, S., Vafaee, F., Young, P. E., Hur, S. S. J., Hawke, S., Devenney, E., Beadnall, H., Barnett, M. H., Suter, C. M., & Buckland, M. E.** (2017). Exosomal microRNA signatures in multiple sclerosis reflect disease status. *Scientific Reports*, 7(1), 14293. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14301-3>
- Efendi, H., & Yandım Kuşçu, D.** (2018). *Multipl Skleroz Tanı ve Tedavi Kılavuzu* (H. Efendi & D. Yandım Kuşçu, Ed.). Galenos Yayınevi. www.galenos.com.tr
- Eis, P. S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M. F., Lund, E., & Dahlberg, J. E.** (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. <https://www.pnas.org>
- Elghouneimy, M. A., Ramadan, M. A., Farrag, E. A., Ibrahim, H. F., Khirala, S. K., Seliem, N., Kasim, S. A., Moazen, E. M., Attia, A. A., Mohammed, F. I., & Ghamry, A. A.** (2023). Impact of miR-155 rs767649 Polymorphism on Rheumatoid Arthritis Activity in Egyptian Patients. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.49297>
- Faraoni, I., Antonetti, F. R., Cardone, J., & Bonmassar, E.** (2009). miR-155 gene: A typical multifunctional microRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(6), 497-505. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.02.013>
- Fenoglio, C., Cantoni, C., De Riz, M., Ridolfi, E., Cortini, F., Serpente, M., Villa, C., Comi, C., Monaco, F., Mellesi, L., Valzelli, S., Bresolin, N., Galimberti, D., & Scarpini, E.** (2011). Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4⁺ cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neuroscience Letters*, 504(1), 9-12. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.08.021>
- Fenoglio, C., De Riz, M., Pietroboni, A. M., Calvi, A., Serpente, M., Cioffi, S. M. G., Arcaro, M., Oldoni, E., Scarpini, E., & Galimberti, D.** (2016). Effect of fingolimod treatment on circulating miR-15b, miR23a and miR-223 levels in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 299, 81-83. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.08.017>

- Fenoglio, C., Ridolfi, E., Cantoni, C., De Riz, M., Bonsi, R., Serpente, M., Villa, C., Pietroboni, A. M., Naismith, R. T., Alvarez, E., Parks, B. J., Bresolin, N., Cross, A. H., Piccio, L. M., Galimberti, D., & Scarpini, E.** (2013). Decreased circulating miRNA levels in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(14), 1938-1942. <https://doi.org/10.1177/1352458513485654>
- Fenoglio, C., Ridolfi, E., Galimberti, D., & Scarpini, E.** (2012). MicroRNAs as active players in the pathogenesis of Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences* (C. 13, Sayı 10, ss. 13227-13239). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms131013227>
- Fernández, O., Izquierdo, G., Aguera, E., Ramo, C., Hernandez, M., Silva, D., Walker, R., Butzkueven, H., Wang, C., & Barnett, M.** (2020). Comparison of first-line and second-line use of fingolimod in relapsing MS: The open-label EARLIMS study. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, 6(3), 205521732095735. <https://doi.org/10.1177/2055217320957358>
- Ferre', L., Clarelli, F., Sferruzza, G., Rocca, M. A., Mascia, E., Radaelli, M., Sangalli, F., Dalla Costa, G., Moiola, L., Aboulwafa, M., Martinelli Boneschi, F., Comi, G., Filippi, M., Martinelli, V., & Esposito, F.** (2018). Basal vitamin D levels and disease activity in multiple sclerosis patients treated with fingolimod. *Neurological Sciences*, 39(8), 1467-1470. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3440-0>
- Feske, S.** (2009). ORAI1 and STIM1 deficiency in human and mice: roles of store-operated Ca^{2+} entry in the immune system and beyond. *Immunological Reviews*, 231(1), 189-209. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00818.x>
- Filippi, M., Bar-Or, A., Piehl, F., Preziosa, P., Solari, A., Vukusic, S., & Rocca, M. A.** (2018). Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0041-4>
- Foster, C. A., Howard, L. M., Schweitzer, A., Persohn, E., Hiestand, P. C., Balatoni, B., Reuschel, R., Beerli, C., Schwartz, M., & Billich, A.** (2007). Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune

encephalomyelitis: Consequences for mode of action in multiple sclerosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(2), 469-476. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.127183>

Frans, G., Meyts, I., Picard, C., Puel, A., Zhang, S.-Y., Moens, L., Wuyts, G., Van der Werff Ten Bosch, J., Casanova, J.-L., & Bossuyt, X. (2014). Addressing diagnostic challenges in primary immunodeficiencies: Laboratory evaluation of Toll-like receptor- and NF- κ B-mediated immune responses. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 51(2), 112-123. <https://doi.org/10.3109/10408363.2014.881317>

Fujitani, M., Zhang, S., Fujiki, R., Fujihara, Y., & Yamashita, T. (2017). A chromosome 16p13.11 microduplication causes hyperactivity through dysregulation of miR-484/protocadherin-19 signaling. *Molecular Psychiatry*, 22(3), 364-374. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.106>

Gafson, A. R., Thorne, T., McKechnie, C. I. J., Jimenez, B., Nicholas, R., & Matthews, P. M. (2018). Lipoprotein markers associated with disability from multiple sclerosis. *Scientific Reports*, 8(1), 17026. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35232-7>

Gandhi, R., Healy, B., Gholipour, T., Egorova, S., Musallam, A., Hussain, M. S., Nejad, P., Patel, B., Hei, H., Khoury, S., Quintana, F., Kivisakk, P., Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2013). Circulating MicroRNAs as biomarkers for disease staging in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 73(6), 729-740. <https://doi.org/10.1002/ana.23880>

Gao, S., Zhang, H., Zuo, X., Xiao, Y., Liu, D., Zhu, H., & Luo, H. (2019). Integrated comparison of the miRNAome and mRNAome in muscles of dermatomyositis and polymyositis reveals common and specific miRNA-mRNAs. *Epigenomics*, 11(1), 23-33. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0064>

Gerrard, B., Singh, V., Babenko, O., Gauthier, I., Wee Yong, V., Kovalchuk, I., Luczak, A., & Metz, G. A. S. (2017). Chronic mild stress exacerbates severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in association with altered non-coding RNA and metabolic biomarkers. *Neuroscience*, 359, 299-307. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.07.033>

- Ghanbari, M., Sedaghat, S., de Looper, H. W. J., Hofman, A., Erkeland, S. J., Franco, O. H., & Dehghan, A.** (2015). The association of common polymorphisms in miR-196a2 with waist to hip ratio and miR-1908 with serum lipid and glucose. *Obesity*, 23(2), 495-503. <https://doi.org/10.1002/oby.20975>
- Ghasemi, N., Razavi, S., & Nikzad, E.** (2016). Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy Citation: Ghasemi N, Razavi Sh, Nikzad E. Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms, diagnoses and cell-based therapy. *CELL JOURNAL(Yakhteh)* (C. 19, Sayı 1).
- Giuliani, A., Lattanzi, S., Ramini, D., Graciotti, L., Danni, M. C., Procopio, A. D., Silvestrini, M., Olivieri, F., & Sabbatinelli, J.** (2021). Potential prognostic value of circulating inflamma-miR-146a-5p and miR-125a-5p in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 54. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2021.103126>
- Golshani, Z., Hojati, Z., Sharifzadeh, A., Shaygannejad, V., & Jafarinia, M.** (2018). Genetic Variation in Intergenic and Exonic miRNA Sequence and Risk of Multiple Sclerosis in the Isfahan Patients. *Iran J Allergy Asthma Immunol. All rights reserved.* 477 Published by Tehran University of Medical Sciences (C. 17, Sayı 5). www.pictar.org
- Goverman, J.** (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology* (C. 9, Sayı 6, ss. 393-407). <https://doi.org/10.1038/nri2550>
- Gökçe, Ş. F., Çiğdem, B., Nemmezi Karaca, S., Bolayir, A., Kayim Yıldız, Ö., Topaktaş, A. S., & Balaban, H.** (2019). Prevalence of multiple sclerosis in an urban population of sivas province in turkey. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 49(1), 288-294. <https://doi.org/10.3906/sag-1808-112>
- Graziano, E., Hagemeyer, J., Weinstock-Guttman, B., Ramasamy, D. P., & Zivadinov, R.** (2015). Increased contrast enhancing lesion activity in relapsing–remitting multiple sclerosis migraine patients. *NeuroImage: Clinical*, 9, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2015.07.013>

- Grigorova, A., Trenova, A., & Stanilova, S.** (2020). A link between promoter polymorphisms of the transforming growth factor β 1 (TGFB1) and TGF- β 1 receptor II (TGFB2) genes and relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Neuropathologica*, 58(4), 307-316. <https://doi.org/10.5114/fn.2020.102433>
- Gross, H. J., & Watson, C.** (2017). Characteristics, burden of illness, and physical functioning of patients with relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis: A cross-sectional US survey. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 13, 1349-1357. <https://doi.org/10.2147/NDT.S132079>
- Haibing, X., Xu, C., Jifu, C., Wenshuang, Z., Ling, L., Yuzhen, C., & Yanjun, H.** (2016). Correlation between CTLA-4 gene rs221775A>G single nucleotide polymorphism and multiple sclerosis susceptibility. A meta-analysis. *Open Medicine*, 11(1), 264-269. <https://doi.org/10.1515/med-2016-0052>
- Hajian-Tilaki, K.** (2013). Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian journal of internal medicine*, 4(2), 627-635.
- Hamid, M. M. A. El, Ali, N. M., Saad, M. N., Mabrouk, M. S., & Shaker, O. G.** (2020). Multiple sclerosis: an associated single-nucleotide polymorphism study on Egyptian population. *Network Modeling Analysis in Health Informatics and Bioinformatics*, 9(1), 48. <https://doi.org/10.1007/s13721-020-00255-6>
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Dobson, R., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V.** (2011). Smoking and multiple sclerosis: An updated meta-analysis. *PLoS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016149>
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., & Ramagopalan, S. V.** (2010). An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS ONE*, 5(9), 1-5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012496>
- Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., Desale, H., Clemons, B., Cahalan, S. M., Schuerer, S. C., Sanna, M. G., Han, G. W., Kuhn, P., Rosen, H., & Stevens, R. C.** (2012). Crystal structure of a lipid

- G protein-coupled receptor. *Science*, 335(6070), 851-855.
<https://doi.org/10.1126/science.1215904>
- He, L., & Hannon, G. J.** (2004). MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews Genetics* (C. 5, Sayı 7, ss. 522-531).
<https://doi.org/10.1038/nrg1379>
- Healy, B. C., Ali, E. N., Guttman, C. R. G., Chitnis, T., Glanz, B. I., Buckle, G., Houtchens, M., Stazzone, L., Moodie, J., Berger, A. M., Duan, Y., Bakshi, R., Khoury, S., Weiner, H., & Ascherio, A.** (2009). Smoking and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*, 66(7).
<https://doi.org/10.1001/archneurol.2009.122>
- Hedström, A. K., Olsson, T., & Alfredsson, L.** (2016). Body mass index during adolescence, rather than childhood, is critical in determining MS risk. *Multiple Sclerosis*, 22(7), 878-883. <https://doi.org/10.1177/1352458515603798>
- Hensiek, A. E.** (2002). HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 72(2), 184-187. <https://doi.org/10.1136/jnnp.72.2.184>
- Hoffman, A. E., Zheng, T., Yi, C., Leaderer, D., Weidhaas, J., Slack, F., Zhang, Y., Paranjape, T., & Zhu, Y.** (2009). microRNA miR-196a-2 and Breast Cancer: A Genetic and Epigenetic Association Study and Functional Analysis. *Cancer Research*, 69(14), 5970-5977. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0236>
- Hornstein, E., Mansfield, J. H., Yekta, S., Hu, J. K. H., Harfe, B. D., McManus, M. T., Baskerville, S., Bartel, D. P., & Tabin, C. J.** (2005). The microRNA miR-196 acts upstream of Hoxb8 and Shh in limb development. *Nature*, 438(7068), 671-674. <https://doi.org/10.1038/nature04138>
- Hu, J., Huang, S., Liu, X., Zhang, Y., Wei, S., & Hu, X.** (2022). MiR-155: An Important Role in Inflammation Response. *Journal of Immunology Research* (C. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/7437281>
- Huang, L., Liu, Y., Wang, L., Chen, R., Ge, W., Lin, Z., Zhang, Y., Liu, S., Shan, Y., Lin, Q., & Jiang, M.** (2013). Down-regulation of miR-301a suppresses pro-

- inflammatory cytokines in T cell-like receptor-triggered macrophages. *Immunology*, 140(3), 314-322. <https://doi.org/10.1111/imm.12139>
- Huang, Y., Yi, X., Jian, Z., Wei, C., Li, S., Cai, C., Zhang, P., Li, K., Guo, S., Liu, L., Shi, Q., Gao, T., & Li, C.** (2013). A single-nucleotide polymorphism of miR-196a-2 and vitiligo: an association study and functional analysis in a Chinese population. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 26(3), 338-347. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12081>
- Hung, P.-S., Chang, K.-W., Kao, S.-Y., Chu, T.-H., Liu, C.-J., & Lin, S.-C.** (2012). Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression. *Oral Oncology*, 48(5), 404-408. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.11.019>
- Iacona, J. R., & Lutz, C. S.** (2019). miR-146a-5p: Expression, regulation, and functions in cancer. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (C. 10, Sayı 4). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/wrna.1533>
- Iranparast, S., Tahmasebi-Birgani, M., Motamedfar, A., Amari, A., & Ghafourian, M.** (2023). miR-155 rs767649 T&A gene polymorphism is associated with downregulation of miR-155 expression, suppressor of cytokine signaling-1 overexpression, and low probability of metastatic tumor at the time of breast cancer diagnosis. *Journal of Research in Medical Sciences*, 28(1), 32. https://doi.org/10.4103/jrms.jrms_960_21
- Iwai, N., & Naraba, H.** (2005). Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(4), 1439-1444. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.051>
- Iyer, A., Zurolo, E., Prabowo, A., Fluiter, K., Spliet, W. G. M., van Rijen, P. C., Gorter, J. A., & Aronica, E.** (2012). MicroRNA-146a: A Key Regulator of Astrocyte-Mediated Inflammatory Response. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044789>
- Jazdzewski, K., Murray, E. L., Franssila, K., Jarzab, B., Schoenberg, D. R., & de la Chapelle, A.** (2008). Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 105(20), 7269-7274.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0802682105>

- Jeffery, D. R., Markowitz, C. E., Reder, A. T., Weinstock-Guttman, B., & Tobias, K.** (2011). Fingolimod for the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 11(2), 165-183. <https://doi.org/10.1586/ern.10.193>
- Jerković, A., Pavelin, S., Šoda, J., Vujović, I., & Rogić Vidaković, M.** (2022). Symptom-Level Disability Status Assessed with an Electronic Unsupervised Patient-Reported Expanded Disability Status Scale (ePR-EDSS) in Multiple Sclerosis Patients—The Example of Croatia. *Journal of Clinical Medicine*, 11(14), 4081. <https://doi.org/10.3390/jcm11144081>
- Jiménez-Morales, S., Gamboa-Becerra, R., Baca, V., Del Río-Navarro, B. E., López-Ley, D. Y., Velázquez-Cruz, R., Saldaña-Alvarez, Y., Salas-Martínez, G., & Orozco, L.** (2012). MiR-146a polymorphism is associated with asthma but not with systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis in Mexican patients. *Tissue Antigens*, 80(4), 317-321. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2012.01929.x>
- Jin, J., Liu, Y., Tang, Q., Yan, X., Jiang, M., Zhao, X., Chen, J., Jin, C., Ou, Q., & Zhao, J.** (2023). Bioinformatics-integrated screening of systemic sclerosis-specific expressed markers to identify therapeutic targets. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1125183>
- Junker, A., Krumbholz, M., Eisele, S., Mohan, H., Augstein, F., Bittner, R., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R., & Meinl, E.** (2009). MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain*, 132(12), 3342-3352. <https://doi.org/10.1093/brain/awp300>
- Jurkin, J., Schichl, Y. M., Koeffel, R., Bauer, T., Richter, S., Konradi, S., Gesslbauer, B., & Strobl, H.** (2010). miR-146a Is Differentially Expressed by Myeloid Dendritic Cell Subsets and Desensitizes Cells to TLR2-Dependent Activation. *The Journal of Immunology*, 184(9), 4955-4965. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903021>

- Jużwik, C. A., S. Drake, S., Zhang, Y., Paradis-Isler, N., Sylvester, A., Amar-Zifkin, A., Douglas, C., Morquette, B., Moore, C. S., & Fournier, A. E.** (2019). microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Progress in Neurobiology* (C. 182). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101664>
- Kacperska, M. J., Walenczak, J., & Tomasik, B.** (2016). Plasmatic microRNA as potential biomarkers of multiple sclerosis: Literature review. *Advances in Clinical and Experimental Medicine* (C. 25, Sayı 4, ss. 775-779). Wrocław University of Medicine. <https://doi.org/10.17219/acem/60098>
- Kalincik, T., Vaneckova, M., Tyblova, M., Krasensky, J., Seidl, Z., Havrdova, E., & Horakova, D.** (2012). Volumetric MRI Markers and Predictors of Disease Activity in Early Multiple Sclerosis: A Longitudinal Cohort Study. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050101>
- Kamal, A., Elgengehy, F. T., Elawady, Z., Fawzy, N. A., & El Sisi, O.** (2022). Role of miR-146a rs2910164 and UTS2 rs228648 Genetic Variants in Behçet's Disease. *Immunological Investigations*, 51(4), 899-908. <https://doi.org/10.1080/08820139.2021.1883647>
- Karajovic, J., Kovacevic, B., Uzelac, B., Stefik, D., Jovanovic, B., Ristic, P., Cerovic, S., & Supic, G.** (2024). Association of HOTAIR, MIR155HG, TERC, miR-155, -196a2, and -146a Genes Polymorphisms with Papillary Thyroid Cancer Susceptibility and Prognosis. *Cancers*, 16(3), 485. <https://doi.org/10.3390/cancers16030485>
- Karni, A., Ben Noon, G., Shiner, T., Vigiser, I., Kolb, H., & Regev, K.** (2022). Differences in MS clinical and epidemiological characteristics between Ashkenazi and non-Ashkenazi Jewish patients in Israel: a retrospective single center study. *Scientific Reports*, 12(1), 4555. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08565-7>
- Kim, T., & Croce, C. M.** (2023). MicroRNA: trends in clinical trials of cancer diagnosis and therapy strategies. *Experimental and Molecular Medicine* (C. 55, Sayı 7, ss. 1314-1321). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01050-9>

- Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M. C.** (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (C. 10, Sayı 2, ss. 126-139). <https://doi.org/10.1038/nrm2632>
- Kim, Y., & Hong, S.-H.** (2023). Associations of leptin receptors and miRNA polymorphisms with susceptibility to hypertension. *Biomedical Reports*, 19(5), 79. <https://doi.org/10.3892/br.2023.1661>
- Kirik, M. P., Pehlivan, M., Nursal, A. F., Oyaci, Y., Pehlivan, S., & SERIN, I.** (2020). The miRNA 196a2 rs11614913 variant has prognostic impact on Turkish patients with multiple myeloma. *BMC Research Notes*, 13(1), 545. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05392-9>
- Kiselev, I., Bashinskaya, V., Kulakova, O., Baulina, N., Popova, E., Boyko, A., & Favorova, O.** (2015). Variants of microRNA genes: Gender-specific associations with multiple sclerosis risk and severity. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 20067-20081. <https://doi.org/10.3390/ijms160820067>
- Koçan, C.** (2018). Psödoeksfolyasyon Sendromu ve Glokomu İle Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (CTGF) Genetik Polimorfizmleri ve CTGF Gözyaşı ve Aköz Seviyeleri Arasındaki İlişkinin İncelenmesi. *TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi*.
- Korotkov, A., Puhakka, N., Gupta, S. Das, Vuokila, N., Broekaart, D. W. M., Anink, J. J., Heiskanen, M., Karttunen, J., van Scheppingen, J., Huitinga, I., Mills, J. D., van Vliet, E. A., Pitkänen, A., & Aronica, E.** (2020). Increased expression of miR142 and miR155 in glial and immune cells after traumatic brain injury may contribute to neuroinflammation via astrocyte activation. *Brain Pathology*, 30(5), 897-912. <https://doi.org/10.1111/bpa.12865>
- Kotelnikova, E., Kiani, N. A., Messinis, D., Pertsovskaya, I., Pliaka, V., Bernardo-Faura, M., Rinas, M., Vila, G., Zubizarreta, I., Pulido-Valdeolivas, I., Sakellaropoulos, T., Faigle, W., Silberberg, G., Masso, M., Stridh, P., Behrens, J., Olsson, T., Martin, R., Paul, & F., Villoslada, P.** (2019). MAPK pathway and B cells overactivation in multiple sclerosis revealed by phosphoproteomics and genomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(19), 9671-9676. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818347116>

- Kuhle, J., Pohl, C., Mehling, M., Edan, G., Freedman, M. S., Hartung, H.-P., Polman, C. H., Miller, D. H., Montalban, X., Barkhof, F., Bauer, L., Dahms, S., Lindberg, R., Kappos, L., & Sandbrink, R.** (2007). Lack of Association between Antimyelin Antibodies and Progression to Multiple Sclerosis *Abstract. N Engl J Med* (C. 356). www.nejm.org
- Kurtzke, J. F.** (1955). A New Scale for Evaluating Disability in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 5(8), 580-580. <https://doi.org/10.1212/WNL.5.8.580>
- Kurtzke, J. F.** (1983). *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS)*. <https://doi.org/10.1212/WNL.33.11.1444>
- Labib, D. A., Shaker, O. G., El Refai, R. M., Ghoniem, S. A., & Elmazny, A.** (2019). Association between *miRNA-146a* and Polymorphisms of its Target Gene, *IRAK1* , Regarding Susceptibility to and Clinical Features of Systemic Lupus Erythematosus and Multiple Sclerosis. *Laboratory Medicine*, 50(1), 34-41. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmy033>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., & Tuschl, T.** (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9(2), 175-179. <https://doi.org/10.1261/rna.2146903>
- Lahiri, D. K., & Schnabel, B.** (1993). DNA isolation by a rapid method from human blood samples: Effects of MgCl₂, EDTA, storage time, and temperature on DNA yield and quality. *Biochemical Genetics*, 31(7-8), 321-328. <https://doi.org/10.1007/BF02401826>
- Lanz, T. V., Brewer, R. C., Ho, P. P., Moon, J.-S., Jude, K. M., Fernandez, D., Fernandes, R. A., Gomez, A. M., Nadj, G.-S., Bartley, C. M., Schubert, R. D., Hawes, I. A., Vazquez, S. E., Iyer, M., Zuchero, J. B., Teegen, B., Dunn, J. E., Lock, C. B., Kipp, L. B., & Robinson, W. H.** (2022). Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature*, 603(7900), 321-327. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04432-7>

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V.** (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Li, H., Ning, M., Li, Q., Wang, T., Li, W., Xiao, J., Wang, L., Wang, K., Zou, R., Hao, F., Yu, M., Shi, Y., Lei, C., Wang, Z., Yang, Z., Xu, H., & Gong, B.** (2023). The association of five polymorphisms with diabetic retinopathy in a Chinese population. *Ophthalmic Genetics*, 44(4), 346-351. <https://doi.org/10.1080/13816810.2023.2194494>
- Li, Y., Du, C., Wang, W., Ma, G., Cui, L., Zhou, H., Tao, H., Yao, L., Zhao, B., & Li, K.** (2015). Genetic Association of MiR-146a with Multiple Sclerosis Susceptibility in the Chinese Population. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(1), 281-291. <https://doi.org/10.1159/000369695>
- Li, Y., Peng, Y., Yao, S., Chen, L., Li, S., Wang, M., Chen, S., Chen, X., Deng, F., Hu, W., Zhu, P., Zhao, B., Zhong, W., & Ma, G.** (2020). Association of *miR-155* and Angiotensin Receptor Type 1 Polymorphisms with the Risk of Ischemic Stroke in a Chinese Population. *DNA and Cell Biology*, 39(1), 92-104. <https://doi.org/10.1089/dna.2019.4948>
- Ligers, A., Xu, C., Saarinen, S., Hillert, J., & Olle Olerup.** (1999). The CTLA-4 gene is associated with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 97(1-2), 182-190. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00072-7](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00072-7)
- Ligouri, M., Pugliatti, M., Giuliani, F., Robertis, F. De, Zimatore, G. B., Livrea, P., Trojano, M., Cocco, E., & Marrosu, M. G.** (2000). Age at onset in multiple sclerosis. *Neurological Sciences*, 21(0), S825-S829. <https://doi.org/10.1007/s100720070020>
- Lima, M. do C. P., Melo, A. S. O., Sena, A. S. S., Barros, V. de O., & Amorim, M. M. R.** (2019). Metabolic syndrome in pregnancy and postpartum: prevalence and associated factors. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 65(12), 1489-1495. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.65.12.1489>
- Limmroth, V., Malessa, R., Zettl, U. K., Koehler, J., Japp, G., Haller, P., Elias, W., Obhof, W., Viehöver, A., Meier, U., Brosig, A., Hasford, J., Putzki, N.,**

- Kalski, G., & Wernsdörfer, C.** (2007). Quality Assessment in Multiple Sclerosis Therapy (QUASIMS). *Journal of Neurology*, 254(1), 67-77. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0281-1>
- Lin, C.-W., Hsieh, Y.-S., Hsin, C.-H., Su, C.-W., Lin, C.-H., Wei, L.-H., Yang, S.-F., & Chien, M.-H.** (2012). Effects of NFKB1 and NFKBIA Gene Polymorphisms on Susceptibility to Environmental Factors and the Clinicopathologic Development of Oral Cancer. *PLoS ONE*, 7(4), e35078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035078>
- Liu, H., Wang, Z., Li, H., Li, M., Han, B., Qi, Y., Wang, H., & Gao, J.** (2022). Label-free Quantitative Proteomic Analysis of Cerebrospinal Fluid and Serum in Patients With Relapse-Relapsing Multiple Sclerosis. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.892491>
- Liu, Y., He, A., Liu, B., Zhong, Y., Liao, X., Yang, J., Chen, J., Wu, J., & Mei, H.** (2018). rs11614913 polymorphism in miRNA-196a2 and cancer risk: an updated meta-analysis. *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 1121-1139. <https://doi.org/10.2147/OTT.S154211>
- Liu, Z., Feng, J., Shi, L., Xu, J., Zhang, B., & Chen, L.J.** (2019). Influences of miR-155/NF- κ B signaling pathway on inflammatory factors in ARDS in neonatal pigs. https://doi.org/10.26355/eurev_201908_18746
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loma, I., & Heyman, R.** (2011). *Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment*.
- Lorincz, B., Jury, E. C., Vrablik, M., Ramanathan, M., & Uher, T.** (2022). The role of cholesterol metabolism in multiple sclerosis: From molecular pathophysiology to radiological and clinical disease activity. *Autoimmunity Reviews*, 21(6), 103088. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2022.103088>
- Löfgren, S. E., Frostegård, J., Truedsson, L., Pons-Estel, B. A., D'Alfonso, S., Witte, T., Lauwerys, B. R., Endreffy, E., Kovács, L., Vasconcelos, C., Martins da Silva, B., Kozyrev, S. V., & Alarcón-Riquelme, M. E.** (2012).

Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes & Immunity*, 13(3), 268-274. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.84>

Lu, J., Gu, H., Tang, Q., Wu, W., Yuan, B., Guo, D., Wei, Y., Sun, H., Xia, Y., Ding, H., Hu, L., Chen, D., Sha, J., & Wang, X. (2016). Common SNP in hsa-miR-196a-2 increases hsa-miR-196a-5p expression and predisposes to idiopathic male infertility in Chinese Han population. *Scientific Reports*, 6(1), 19825. <https://doi.org/10.1038/srep19825>

Lu, L. F., Boldin, M. P., Chaudhry, A., Lin, L. L., Taganov, K. D., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D., & Rudensky, A. Y. (2010). Function of miR-146a in Controlling Treg Cell-Mediated Regulation of Th1 Responses. *Cell*, 142(6), 914-929. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.012>

Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Soelberg Sørensen, P., Alan Thompson, Dms. J., Wolinsky, J. S., Balcer, L. J., Brenda Banwell, M., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P. A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Inglese, M., Kappos, L., & Polman, C. H. (2014). *VIEWS & REVIEWS Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions.*

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

Lukács, J., Soltész, B., Penyige, A., Nagy, B., & Póka, R. (2019). Identification of miR-146a and miR-196a-2 single nucleotide polymorphisms at patients with high-grade serous ovarian cancer. *Journal of Biotechnology*, 297, 54-57. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.016>

Maciak, K., Dzedzic, A., Miller, E., & Saluk-bijak, J. (2021). Mir-155 as an important regulator of multiple sclerosis pathogenesis. A review. *International Journal of Molecular Sciences* (C. 22, Sayı 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22094332>

- Maeda, A., & Sobel, R. A.** (1996). Matrix Metalloproteinases in the Normal Human Central Nervous System, Microglial Nodules, and Multiple Sclerosis Lesions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(3), 300-309. <https://doi.org/10.1097/00005072-199603000-00005>
- Magyari, M., & Koch-Henriksen, N.** (2022). Quantitative effect of sex on disease activity and disability accumulation in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 93(7), 716-722. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-328994>
- Maharaj, A. B., Naidoo, P., Ghazi, T., Abdul, N. S., Dhani, S., Docrat, T. F., Ramkaran, P., Tak, P.-P., de Vries, N., & Chuturgoon, A. A.** (2018). MiR-146a G/C rs2910164 variation in South African Indian and Caucasian patients with psoriatic arthritis. *BMC Medical Genetics*, 19(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12881-018-0565-1>
- Mameli, G., Arru, G., Caggiu, E., Niegowska, M., Leoni, S., Madeddu, G., Babudieri, S., Sechi, G. Pietro, & Sechi, L. A.** (2016). Natalizumab Therapy Modulates miR-155, miR-26a and Proinflammatory Cytokine Expression in MS Patients. *PLOS ONE*, 11(6), e0157153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157153>
- Mancuso, R., Hernis, A., Agostini, S., Rovaris, M., Caputo, D., & Clerici, M.** (2015). MicroRNA-572 expression in multiple sclerosis patients with different patterns of clinical progression. *Journal of Translational Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0504-2>
- Manouchehrinia, A., Tench, C. R., Maxted, J., Bibani, R. H., Britton, J., & Constantinescu, C. S.** (2013). Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain*, 136(7), 2298-2304. <https://doi.org/10.1093/brain/awt139>
- Mansfield, J. H., Harfe, B. D., Nissen, R., Obenauer, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A. E., Ruvkun, G., Sharp, P. A., Tabin, C. J., & McManus, M. T.** (2004). MicroRNA-responsive “sensor” transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of

vertebrate microRNA expression. *Nature Genetics*, 36(10), 1079-1083.
<https://doi.org/10.1038/ng1421>

Martin, N. A., Hyrlov, K. H., Elkjaer, M. L., Thygesen, E. K., Wlodarczyk, A., Elbaek, K. J., Aboo, C., Okarmus, J., Benedikz, E., Reynolds, R., Hegedus, Z., Stensballe, A., Svenningsen, Å. F., Owens, T., & Illes, Z. (2020). Absence of miRNA-146a Differentially Alters Microglia Function and Proteome. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01110>

McCoy, C. E. (2017). miR-155 dysregulation and therapeutic intervention in multiple sclerosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology* (C. 1024, ss. 111-131). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5987-2_5

McGinley, M. P., & Cohen, J. A. (2021). Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis and other conditions. *The Lancet* (C. 398, Sayı 10306, ss. 1184-1194). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00244-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00244-0)

Mehling, M., Brinkmann, V., Antel, J., Bar-Or, A., Goebels, N., Vedrine, C., Kristofic, C., Kuhle, J., Lindberg, R. L. P., & Kappos, L. (2008). FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology*, 71(16), 1261-1267.
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000327609.57688.ea>

Meissinger, H. F., & Bekey, G. A. (1966). An analysis of continuous parameter identification methods. *Simulation*, 6(2), 94-102.

Mohammed, E. M. (2018). Multiple Sclerosis and the Pathogenicity of Mir-155. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 9(4).
<https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.09.001841>

Monticelli, S., Ansel, K. M., Xiao, C., Socci, N. D., Krichevsky, A. M., Thai, T. H., Rajewsky, N., Marks, D. S., Sander, C., Rajewsky, K., Rao, A., & Kosik, K. S. (2005). MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome biology*, 6(8). <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-r71>

MSIF. (2020). www.atlasofms.org

- Munger, K. L., Bentzen, J., Laursen, B., Stenager, E., Koch-Henriksen, N., Sørensen, T. I. A., & Baker, J. L.** (2013). Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: A long-term cohort study. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(10), 1323-1329. <https://doi.org/10.1177/1352458513483889>
- Murakami, M., Arima, Y., Ogura, H., & Kamimura, D.** (2013). The gateway theory: How regional neural activation creates a gateway for immune cells via an inflammation amplifier. *Biomedical Journal*, 36(6), 269. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.113187>
- Muriel, P.** (2009). NF- κ B in liver diseases: a target for drug therapy. *Journal of Applied Toxicology*, 29(2), 91-100. <https://doi.org/10.1002/jat.1393>
- Nataf, S., Barritault, M., & Pays, L.** (2017). A Unique TGFB1-Driven Genomic Program Links Astrocytosis, Low-Grade Inflammation and Partial Demyelination in Spinal Cord Periplaques from Progressive Multiple Sclerosis Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2097. <https://doi.org/10.3390/ijms18102097>
- Nataf, S., Guillen, M., & Pays, L.** (2019). TGFB1-Mediated Gliosis in Multiple Sclerosis Spinal Cords Is Favored by the Regionalized Expression of HOXA5 and the Age-Dependent Decline in Androgen Receptor Ligands. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5934. <https://doi.org/10.3390/ijms20235934>
- Nelson, M. R., Marnellos, G., Kammerer, S., Hoyal, C. R., Shi, M. M., Cantor, C. R., & Braun, A.** (2004). Large-Scale Validation of Single Nucleotide Polymorphisms in Gene Regions. *Genome Research*, 14(8), 1664-1668. <https://doi.org/10.1101/gr.2421604>
- Newman, T. A.** (2001). T-cell- and macrophage-mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain*, 124(11), 2203-2214. <https://doi.org/10.1093/brain/124.11.2203>
- Nezhad, N. N., Parnow, A., Khamoushian, K., Eslami, R., & Baker, J. S.** (2024). Resistance training modifies of serum levels of matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in multiple sclerosis women - a

randomized controlled trial. *BMC Neuroscience*, 25(1), 13.
<https://doi.org/10.1186/s12868-024-00856-1>

Niu, X., Liu, Z., Wang, J., & Wu, D. (2023). Green tea EGCG inhibits naïve CD4⁺ T cell division and progression in mice: An integration of network pharmacology, molecular docking and experimental validation. *Current Research in Food Science*, 7, 100537. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100537>

Niwald, M., Migdalska-Sęk, M., Brzezińska-Lasota, E., & Miller, E. (2017). Evaluation of Selected MicroRNAs Expression in Remission Phase of Multiple Sclerosis and Their Potential Link to Cognition, Depression, and Disability. *Journal of Molecular Neuroscience*, 63(3-4), 275-282.
<https://doi.org/10.1007/s12031-017-0977-y>

O'Connell, R. M., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2012). MicroRNA regulation of inflammatory responses. *Annual Review of Immunology* (C. 30, ss. 295-312).
<https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075013>

Oh-hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., Prakriya, M., Feske, S., & Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*, 9(4), 432-443. <https://doi.org/10.1038/ni1574>

Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2016). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* (C. 13, Sayı 1, ss. 26-36). Nature Publishing Group.
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187>

Oner, T., Yenmis, G., Tombulturk, K., Cam, C., Kucuk, O. S., Yakicier, M. C., Dizman, D., & Sultuybek, G. K. (2015). Association of Pre-miRNA-499 rs3746444 and Pre-miRNA-146a rs2910164 Polymorphisms and Susceptibility to Behcet's Disease. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 19(8), 424-430.
<https://doi.org/10.1089/gtmb.2015.0016>

O'Reilly, S. (2018). Toll Like Receptors in systemic sclerosis: An emerging target. *Immunology Letters*, 195, 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.09.001>

- Palavra, F., Marado, D., Mascarenhas-Melo, F., Sereno, J., Teixeira-Lemos, E., Nunes, C. C., Gonçalves, G., Teixeira, F., & Reis, F.** (2013). New markers of early cardiovascular risk in multiple sclerosis patients: oxidized-LDL correlates with clinical staging. *Disease markers*, 34(5), 341-348. <https://doi.org/10.3233/DMA-130979>
- Paolillo, A., Pozzilli, C., Giugni, E., Tomassini, V., Gasperini, C., Fiorelli, M., Mainero, C., Horsfield, M., Galgani, S., Bastianello, S., & Buttinelli, C.** (2002). A 6-year clinical and MRI follow-up study of patients with relapsing–remitting multiple sclerosis treated with Interferon-beta. *European Journal of Neurology*, 9(6), 645-655. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2002.00476.x>
- Pasquinelli, A. E.** (2012). MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics* (C. 13, Sayı 4, ss. 271-282). <https://doi.org/10.1038/nrg3162>
- Patsopoulos, N. A.** (2018). Genetics of multiple sclerosis: An overview and new directions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028951>
- Patsopoulos, N. A., Baranzini, S. E., Santaniello, A., Shoostari, P., Cotsapas, C., Wong, G., Beecham, A. H., James, T., Replogle, J., Vlachos, I. S., McCabe, C., Pers, T. H., Brandes, A., White, C., Keenan, B., Cimpean, M., Winn, P., Panteliadis, I.-P., Robbins, A., & De Jager, P. L.** (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*, 365(6460). <https://doi.org/10.1126/science.aav7188>
- Pehlivan, S., Gürsoy, S., Nursal, A. F., Akaltun, M. S., Özdilli, K., & Pehlivan, M.** (2020). Türk Popülasyonunda Ankilozan Spondilite Yatkınlık Sağlayıcı Faktör Olarak Mir-196a2t/C Varyantı. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi*, 83(2). <https://doi.org/10.26650/IUITFD.2019.0023>
- Perdaens, O., Dang, H. A., D’Auria, L., & van Pesch, V.** (2020). CSF microRNAs discriminate MS activity and share similarity to other neuroinflammatory disorders. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 7(2). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000673>

- Pin, A. L., Houle, F., Fournier, P., Guillonneau, M., Paquet, É. R., Simard, M. J., Royal, I., & Huot, J.** (2012). Annexin-1-mediated endothelial cell migration and angiogenesis are regulated by vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced inhibition of miR-196a expression. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30541-30551. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.393561>
- Pineda-Torra, I., Siddique, S., Waddington, K. E., Farrell, R., & Jury, E. C.** (2021). Disrupted Lipid Metabolism in Multiple Sclerosis: A Role for Liver X Receptors? *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.639757>
- Piri Cinar, B., & Guven Yorgun, Y.** (2018). What We Learned from The History of Multiple Sclerosis Measurement: Expanded Disease Status Scale. *Archives of Neuropsychiatry*. <https://doi.org/10.29399/npa.23343>
- Polina, E. R., Oliveira, F. M., Sbruzzi, R. C., Crispim, D., Canani, L. H., & Santos, K. G.** (2019). Gene polymorphism and plasma levels of miR-155 in diabetic retinopathy. *Endocrine Connections*, 8(12), 1591-1599. <https://doi.org/10.1530/EC-19-0446>
- Ponce, C., Torres, M., Galleguillos, C., Sovino, H., Boric, M. A., Fuentes, A., & Johnson, M. C.** (2009). Nuclear factor κ B pathway and interleukin-6 are affected in eutopic endometrium of women with endometriosis. *REPRODUCTION*, 137(4), 727-737. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0407>
- Poser, C. M., Paty, D. W., Scheinberg, L., McDonald, W. I., Davis, F. A., Ebers, G. C., Johnson, K. P., Sibley, W. A., Silberberg, D. H., & Tourtellotte, W. W.** (1983). New diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines for research protocols. *Annals of Neurology*, 13(3), 227-231. <https://doi.org/10.1002/ana.410130302>
- Qi, J., Hou, S., Zhang, Q., Liao, D., Wei, L., Fang, J., Zhou, Y., Kijlstra, A., & Yang, P.** (2013). A functional variant of pre-miRNA-196a2 confers risk for Behcet's disease but not for Vogt-Koyanagi-Harada syndrome or AAU in ankylosing spondylitis. *Human Genetics*, 132(12), 1395-1404. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1346-8>

- Qi, P., Dou, T., Geng, L., Zhou, F., Gu, X., Wang, H., & Gao, C.** (2010). Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Human Immunology*, 71(6), 621-626. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2010.02.017>
- Qiu, R., Liu, Y., Wu, J. Y., Liu, K., Mo, W., & He, R.** (2009). Misexpression of miR-196a induces eye anomaly in *Xenopus laevis*. *Brain Research Bulletin*, 79(1), 26-31. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.12.009>
- Rana, S., Rogers, L. J., & Halliday, G. M.** (2011). Systemic low-dose UVB inhibits CD8 T cells and skin inflammation by alternative and novel mechanisms. *American Journal of Pathology*, 178(6), 2783-2791. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.02.016>
- Rauma, I., Huhtala, H., Soilu-Hänninen, M., & Kuusisto, H.** (2020). Lipid Profile Alterations during Fingolimod Treatment in Multiple Sclerosis Patients. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 15(4), 567-569. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09937-4>
- Regev, K., Healy, B. C., Paul, A., Diaz-Cruz, C., Mazzola, M. A., Raheja, R., Glanz, B. I., Kivisäkk, P., Chitnis, T., Jagodic, M., Piehl, F., Olsson, T., Khademi, M., Hauser, S., Oksenberg, J., Khoury, S. J., Weiner, H. L., & Gandhi, R.** (2018). Identification of MS-specific serum miRNAs in an international multicenter study. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 5(5). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000491>
- Rehmsmeier, M., Stefen, P., Höchsmann, M., & Giegerich, R.** (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 10(10), 1507-1517. <https://doi.org/10.1261/rna.5248604>
- Reich, D. S., Lucchinetti, C. F., & Calabresi, P. A.** (2018). Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 378(2), 169-180. <https://doi.org/10.1056/nejmra1401483>
- Reijerkerk, A., Lopez-Ramirez, M. A., van het Hof, B., Drexhage, J. A. R., Kamphuis, W. W., Kooij, G., Vos, J. B., van der Pouw Kraan, T. C. T. M.,**

- van Zonneveld, A. J., Horrevoets, A. J., Prat, A., Romero, I. A., & de Vries, H. E. (2013).** MicroRNAs Regulate Human Brain Endothelial Cell-Barrier Function in Inflammation: Implications for Multiple Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*, 33(16), 6857-6863. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3965-12.2013>
- Ribbons, K. A., McElduff, P., Boz, C., Trojano, M., Izquierdo, G., Duquette, P., Girard, M., Grand'Maison, F., Hupperts, R., Grammond, P., Oreja-Guevara, C., Petersen, T., Bergamaschi, R., Giuliani, G., Barnett, M., van Pesch, V., Amato, M.-P., Iuliano, G., Fiol, M., & Lechner-Scott, J. (2015).** Male Sex Is Independently Associated with Faster Disability Accumulation in Relapse-Onset MS but Not in Primary Progressive MS. *PLOS ONE*, 10(6), e0122686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122686>
- Rodriguez, A., Vigorito, E., Clare, S., Warren, M. V., Couttet, P., Soond, D. R., Van Dongen, S., Grocock, R. J., Das, P. P., Miska, E. A., Vetrie, D., Okkenhaug, K., Enright, A. J., Dougan, G., Turner, M., & Bradley, A. (2007).** Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, 316(5824), 608-611. <https://doi.org/10.1126/science.1139253>
- Roosbehkia, M., Mahmoudi, M., Aletaha, S., Rezaei, N., Fattahi, M. J., Jafarnejhad-Ansariha, F., Barati, A., & Mirshafiey, A. (2017).** The potent suppressive effect of β -d-mannuronic acid (M2000) on molecular expression of the TLR/NF- κ B Signaling Pathway in ankylosing spondylitis patients. *International Immunopharmacology*, 52, 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.08.018>
- Rotstein, D. L., Healy, B. C., Malik, M. T., Carruthers, R. L., Musallam, A. J., Kivisakk, P., Weiner, H. L., Glanz, B., & Chitnis, T. (2015).** Effect of vitamin D on MS activity by disease-modifying therapy class. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 2(6). <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000167>
- Rottlaender, A., Villwock, H., Addicks, K., & Kuerten, S. (2011).** Neuroprotective role of fibroblast growth factor-2 in experimental autoimmune encephalomyelitis.

Immunology, 133(3), 370-378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03450.x>

Roxburgh, R. H. S. R., Seaman, S. R., Masterman, T., Hensiek, A. E., Sawcer, S. J., Vukusic, S., Achiti, I., Confavreux, C., Coustans, M., le Page, E., Edan, G., McDonnell, G. V., Hawkins, S., Trojano, M., Liguori, M., Cocco, E., Marrosu, M. G., Tesser, F., Leone, M. A., & Compston, D. A. S. (2005). Multiple Sclerosis Severity Score. *Neurology*, 64(7), 1144-1151. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8>

Ruffini, F., Furlan, R., Poliani, P., Brambilla, E., Marconi, P., Bergami, A., Desina, G., Glorioso, J., Comi, G., & Martino, G. (2001). Fibroblast growth factor-II gene therapy reverts the clinical course and the pathological signs of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Gene Therapy*, 8(16), 1207-1213. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301523>

Rusca, N., & Monticelli, S. (2011). MiR-146a in Immunity and Disease. *Molecular Biology International*, 2011, 1-7. <https://doi.org/10.4061/2011/437301>

Saba, R., Sorensen, D. L., & Booth, S. A. (2014). MicroRNA-146a: A dominant, negative regulator of the innate immune response. *Frontiers in Immunology* (C. 5, Sayı NOV). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00578>

Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2009). Response surface methodology. Chapitre 1.12. Comprehensive chemometrics: chemical and biochemical data analysis. Editeurs scientifiques. Elsevier, Amsterdam.

Safi, N. V., & Krieger, S. (2021). Men with multiple sclerosis. *Pract. Neurol*, 37, 37-40.

Sancho-Rodríguez, N., Avilés-Plaza, F. V, Granero-Fernández, E., Hernández-Martínez, A. M., Albaladejo-Otón, M., Martínez-Mernández, P., & Parra-Pallarés, S. (2011). Observational study of lipid profile and LDL particle size in patients with metabolic syndrome. *Lipids in Health and Disease*, 10(1), 162. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-162>

Saridas, F., Tezcan Unlu, H., Cecener, G., Egeli, U., Sabour Takanlou, M., Sabour Takanlou, L., Tunca, B., Zarifoglu, M., Turan, O. F., & Taskapilioglu, O.

- (2022). The expression and prognostic value of miR-146a and miR-155 in Turkish patients with multiple sclerosis. *Neurological Research*, 44(3), 217-223. <https://doi.org/10.1080/01616412.2021.1975221>
- Schreiner, T. G., & Genes, T. M.** (2021). Obesity and multiple sclerosis—a multifaceted association. *Journal of Clinical Medicine* (C. 10, Sayı 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm10122689>
- Schumacher, G. A., Beebe, G., Kibler, R. F., Kurland, L. T., Kurtzke, J. F., McDowell, F., Nagler, B., Sibley, W. A., Tourtellotte, W. W., & Willmon, T. L.** (1965). Problems Of Experimental Trials Of Therapy In Multiple Sclerosis: Report By The Panel On The Evaluation Of Experimental Trials Of Therapy In Multiple Sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 122(1), 552-568. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1965.tb20235.x>
- Seddiki, N., Brezar, V., Ruffin, N., Lévy, Y., & Swaminathan, S.** (2014). Role of miR-155 in the regulation of lymphocyte immune function and disease. *Immunology*, 142(1), 32-38. <https://doi.org/10.1111/imm.12227>
- Séguin, R., Biernacki, K., Rotondo, R. L., Prat, A., & Antel, J. P.** (2003). Regulation and Functional Effects of Monocyte Migration across Human Brain-Derived Endothelial Cells. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62(4), 412-419. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.4.412>
- Sena, A., Macedo, A., Ferret-Sena, V., Capela, C., & Pedrosa, R.** (2019). Serum Lipoprotein Profile Is Associated With Protective Effects of Oral Contraceptive Use on Multiple Sclerosis Severity: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Neurology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00060>
- Shaker, O. G., Abdelaleem, O. O., Fouad, N. A., Ali, A. M. E. A., Ahmed, T. I., Ibrahim, E. G., & Abdelghaffar, N. K.** (2019). Association Between miR-155, Its Polymorphism and Ischemia-Modified Albumin in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 39(7), 428-437. <https://doi.org/10.1089/jir.2019.0001>
- Shang, Z., Sun, W., Zhang, M., Xu, L., Jia, X., Zhang, R., & Fu, S.** (2020). Identification of key genes associated with multiple sclerosis based on gene

- expression data from peripheral blood mononuclear cells. *PeerJ*, 8, e8357.
<https://doi.org/10.7717/peerj.8357>
- Shao, J., Ding, Z., Peng, J., Zhou, R., Li, L., Qian, Q., & Chen, Y.** (2020). MiR-146a-5p promotes IL-1 β -induced chondrocyte apoptosis through the TRAF6-mediated NF-kB pathway. *Inflammation Research*, 69(6), 619-630.
<https://doi.org/10.1007/s00011-020-01346-w>
- Shareef, S., Ebrahimi, S. O., & Reisi, S.** (2021). Contribution of Hsa-Mir-146A and Hsa-Mir-223 Gene Variations in Patients with Multiple Sclerosis Reveals Association of Rs2910164 and Rs1044165 with Risk of Multiple Sclerosis Susceptibility. *Journal of Investigative Medicine*, 69(5), 1015-1021.
<https://doi.org/10.1136/jim-2020-001539>
- Shen, J., Ambrosone, C. B., DiCioccio, R. A., Odunsi, K., Lele, S. B., & Zhao, H.** (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*, 29(10), 1963-1966.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgn172>
- Singh, S., Rai, G., & Aggarwal, A.** (2014). Association of microRNA-146a and its target gene IRAK1 polymorphism with enthesitis related arthritis category of juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology International*, 34(10), 1395-1400.
<https://doi.org/10.1007/s00296-014-3001-7>
- Sintzel, M. B., Rametta, M., & Reder, A. T.** (2018). Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurology and Therapy*, 7(1), 59-85.
<https://doi.org/10.1007/s40120-017-0086-4>
- Slota, J. A., & Booth, S. A.** (2019). MicroRNAs in neuroinflammation: Implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications. *Non-coding RNA* (C. 5, Sayı 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ncrna5020035>
- Smolders, J., Menheere, P., Kessels, A., Damoiseaux, J., & Hupperts, R.** (2008). Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 14(9), 1220-1224.
<https://doi.org/10.1177/1352458508094399>

- Sohel, M. H.** (2016). Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences*, 10(2), 175-186. <https://doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007>
- Søndergaard, H. B., Hesse, D., Krakauer, M., Sørensen, P. S., & Sellebjerg, F.** (2013). Differential microRNA expression in blood in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 19(14), 1849-1857. <https://doi.org/10.1177/1352458513490542>
- S.R. Mohammed, O.G. Shaker, A.A. Mohammed, N.A. Fouad, H.A. Hussein, N.A. Ahmed, O.M. Ahmed, D.Y. Ali, M.M. Mohamed, & A.A. Ibrahim.** (2021). *Impact of miR-155 (rs767649 A>T) and miR-146a (rs57095329 A>G) polymorphisms in System Lupus Erythematosus susceptibility in an Egyptian cohort.*
- Su, W., Hopkins, S., Nesser, N. K., Sopher, B., Silvestroni, A., Ammanuel, S., Jayadev, S., Möller, T., Weinstein, J., & Garden, G. A.** (2014). The p53 Transcription Factor Modulates Microglia Behavior through MicroRNA-Dependent Regulation of c-Maf. *The Journal of Immunology*, 192(1), 358-366. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301397>
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D.** (2006). *NF-B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses.* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0605298103
- Tettey, P., Simpson, S., Taylor, B., Blizzard, L., Ponsonby, A.-L., Dwyer, T., Kostner, K., & van der Mei, I.** (2014). An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in people with MS. *Multiple Sclerosis Journal*, 20(13), 1737-1744. <https://doi.org/10.1177/1352458514533162>
- Tettey, P., Simpson, S., Taylor, B., Ponsonby, A.-L., Lucas, R. M., Dwyer, T., Kostner, K., & van der Mei, I. A.** (2017). An adverse lipid profile and increased levels of adiposity significantly predict clinical course after a first demyelinating event. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 88(5), 395-401. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-315037>

- Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., & Cohen, J. A. (2018).** Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* (C. 17, Sayı 2, ss. 162-173). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B., & Ciccarelli, O. (2018).** Multiple sclerosis. *The Lancet* (C. 391, Sayı 10130, ss. 1622-1636). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1)
- Thouvenot, E., Orsini, M., Daures, J. -P., & Camu, W. (2015).** Vitamin D is associated with degree of disability in patients with fully ambulatory relapsing–remitting multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 22(3), 564-569. <https://doi.org/10.1111/ene.12617>
- Toraih, E. A., Fawz, M. S., Elgazzaz, M. G., Hussein, M. H., Shehata, R. H., & Daoud, H. G. (2016).** Combined Genotype Analyses of Precursor miRNA196a2 and 499a Variants with Hepatic and Renal Cancer Susceptibility a Preliminary Study. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 17(7), 3369-3375.
- Toraih, E. A., Ismail, N. M., Toraih, A. A., Hussein, M. H., & Fawzy, M. S. (2016).** Precursor miR-499a Variant but not miR-196a2 is Associated with Rheumatoid Arthritis Susceptibility in an Egyptian Population. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 20(3), 279-295. <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0194-3>
- Tunçdemir, M., Yenmiş, G., Tombultürk, K., Arkan, H., Soydaş, T., Burak Tek, R., Altıntaş, Ö., Özkara, H., & Kanıgür-Sultuybek, G. (2018).** NFKB1 rs28362491 and pre-miRNA-146a rs2910164 SNPs on E-Cadherin expression in case of idiopathic oligospermia: A case-control study. *International journal of reproductive biomedicine*, 16(4), 247-254.
- Vistbakka, J., Elovaara, I., Lehtimäki, T., & Hagman, S. (2017).** Circulating microRNAs as biomarkers in progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 23(3), 403-412. <https://doi.org/10.1177/1352458516651141>

- Vistbakka, J., Sumelahti, M.-L., Lehtimäki, T., Elovaara, I., & Hagman, S.** (2018). Evaluation of serum miR-191-5p, miR-24-3p, miR-128-3p, and miR-376c-3 in multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, 138(2), 130-136. <https://doi.org/10.1111/ane.12921>
- Vogrinc, D., Gregorič Kramberger, M., Emeršič, A., Čučnik, S., Goričar, K., & Dolžan, V.** (2023). Genetic Polymorphisms in Oxidative Stress and Inflammatory Pathways as Potential Biomarkers in Alzheimer's Disease and Dementia. *Antioxidants*, 12(2), 316. <https://doi.org/10.3390/antiox12020316>
- Wallin, M. T., Culpepper, W. J., Nichols, E., Bhutta, Z. A., Gebrehiwot, T. T., Hay, S. I., Khalil, I. A., Krohn, K. J., Liang, X., Naghavi, M., Mokdad, A. H., Nixon, M. R., Reiner, R. C., Sartorius, B., Smith, M., Topor-Madry, R., Werdecker, A., Vos, T., Feigin, V. L., & Murray, C. J. L.** (2019). Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*, 18(3), 269-285. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30443-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30443-5)
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., & Baneke, P.** (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1816-1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Wang, J., Dong, L.-N., Wang, M., Guo, J., & Zhao, Y.-Q.** (2019). MiR-146a regulates the development of ulcerative colitis via mediating the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway. 2151-2157. https://doi.org/10.26355/eurev_201903_17260
- Wang, R., Wei, A., Zhang, Y., Xu, G., Nong, X., Liu, C., Zeng, Y., Huang, H., Pang, X., Wei, W., Wang, C., & Huang, H.** (2022). Association between genetic variants of microRNA-21 and microRNA-155 and systemic lupus erythematosus: A case-control study from a Chinese population. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(7). <https://doi.org/10.1002/jcla.24518>

- Wang, S., Cao, X., Ding, B., Chen, J., Cui, M., Xu, Y., Lu, X., Zhang, Z., He, A., & Jin, H.** (2016). The rs767649 polymorphism in the promoter of miR-155 contributes to the decreased risk for cervical cancer in a Chinese population. *Gene*, 595(1), 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.002>
- Wang, Z. M., Dong, X. Y., & Cong, S. Y.** (2020). Bioinformatic analysis of a microRNA regulatory network in Huntington's disease. *Journal of Integrative Neuroscience*, 19(4), 641-650. <https://doi.org/10.31083/J.JIN.2020.04.203>
- Waschbisch, A., Atiya, M., Linker, R. A., Potapov, S., Schwab, S., & Derfuss, T.** (2011). Glatiramer Acetate Treatment Normalizes Deregulated microRNA Expression in Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *PLoS ONE*, 6(9), e24604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024604>
- Weinstock-Guttman, B., Zivadinov, R., Mahfooz, N., Carl, E., Drake, A., Schneider, J., Teter, B., Hussein, S., Mehta, B., Weiskopf, M., Durfee, J., Bergsland, N., & Ramanathan, M.** (2011). Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), 127. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-127>
- Willis, M. A., & Cohen, J. A.** (2013). Fingolimod therapy for multiple sclerosis. *Seminars in Neurology*, 33(1), 37-44. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1343794>
- Wu, D., Cerutti, C., Lopez-Ramirez, M. A., Pryce, G., King-Robson, J., Simpson, J. E., Van Der Pol, S. M. A., Hirst, M. C., De Vries, H. E., Sharrack, B., Baker, D., Male, D. K., Michael, G. J., & Romero, I. A.** (2015). Brain endothelial miR-146a negatively modulates T-cell adhesion through repressing multiple targets to inhibit NF- κ B activation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35(3), 412-423. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.207>
- Wu, J., Olsson, T., Hillert, J., Alfredsson, L., & Hedström, A. K.** (2023). Influence of oral tobacco versus smoking on multiple sclerosis disease activity and progression. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 94(8), 589-596. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-330848>
- Wu, J.-S., Qiu, W., Castley, A., James, I., Mastaglia, F. L., Christiansen, F. T., Carroll, W. M., Joseph, J., & Kermode, A. G.** (2010). Modifying effects of

HLA-DRB1 allele interactions on age at onset of multiple sclerosis in Western Australia. *Multiple Sclerosis Journal*, 16(1), 15-20. <https://doi.org/10.1177/1352458509350312>

Xiaoyan, W., Pais, E. M. A., Lan, L., Jingrui, C., Lin, M., Fordjour, P. A., & Guanwei, F. (2017). MicroRNA-155: a Novel Armamentarium Against Inflammatory Diseases. *Inflammation* (C. 40, Sayı 2, ss. 708-716). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0488-y>

Xie, K., Ma, H., Liang, C., Wang, C., Qin, N., Shen, W., Gu, Y., Yan, C., Zhang, K., Dai, N., Zhu, M., Wu, S., Wang, H., Dai, J., Jin, G., Shen, H., & Hu, Z. (2015). A functional variant in miR-155 regulation region contributes to lung cancer risk and survival. *Oncotarget*, 6(40), 42781-42792. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5840>

Xie, X., Peng, L., Zhu, J., Zhou, Y., Li, L., Chen, Y., Yu, S., & Zhao, Y. (2017). miR-145-5p/Nurr1/TNF- α Signaling-Induced Microglia Activation Regulates Neuron Injury of Acute Cerebral Ischemic/Reperfusion in Rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00383>

Xiong, X., Cho, M., Cai, X., Cheng, J., Jing, X., Cen, J., Liu, X., Yang, X., & Suh, Y. (2014). A common variant in pre-miR-146 is associated with coronary artery disease risk and its mature miRNA expression. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 761, 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.01.001>

Xu, T., Zhu, Y., Wei, Q.-K., Yuan, Y., Zhou, F., Ge, Y.-Y., Yang, J.-R., Su, H., & Zhuang, S.-M. (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 29(11), 2126-2131. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn195>

Xu, W. D., Feng, S. Y., & Huang, A. F. (2022). Role of miR-155 in inflammatory autoimmune diseases: a comprehensive review. *Inflammation Research* (C. 71, Sayı 12, ss. 1501-1517). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01643-6>

- Yadav, S. K., Mindur, J. E., Ito, K., & Dhib-Jalbut, S. (2015).** Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology* (C. 28, Sayı 3, ss. 206-219). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000205>
- Yang, B., Zhang, J. L., Shi, Y. Y., Li, D. D., Chen, J., Huang, Z. C., Cai, B., Song, X. B., Li, L. X., Ying, B. W., & Wang, L. L. (2011).** Association study of single nucleotide polymorphisms in pre-miRNA and rheumatoid arthritis in a Han Chinese population. *Molecular Biology Reports*, 38(8), 4913-4919. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0633-x>
- Yao, F., Shi, W., Fang, F., Lv, M. Y., Xu, M., Wu, S. Y., & Huang, C. L. (2023).** Exosomal miR-196a-5p enhances radioresistance in lung cancer cells by downregulating NFKBIA. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 39(6), 554-564. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12673>
- Yekta, S., Shih, I.-H., & Bartel, D. P. (2004).** MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *New Series* (C. 304, Sayı 5670).
- Yenmis, G., Soydas, T., Ekmekci, C. G., Yazici Guvercin, A. C., Kucuk, O. S., & Sultuybek, G. K. (2021).** Fas and microRNAs Variations as a Possible Risk for Behçet Disease. *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*, 27(8), 306-310. <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000001254>
- Zamani, A., Dehghan Manshadi, M., Akouchekian, M., & Salahshouri far, I. (2024).** The Association of miRNA-146a Gene Variation and Multiple Sclerosis in The Iranian Population. *Medical Journal of The Islamic Republic of Iran*. <https://doi.org/10.47176/mjiri.38.1>
- Zanoni, M., Orlandi, E., Rossetti, G., Turatti, M., Calabrese, M., Gomez Lira, M., & Gajofatto, A. (2020).** Upregulated serum miR-128-3p in progressive and relapse-free multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica* (C. 142, Sayı 5, ss. 511-516). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ane.13288>
- Zhang, B., Wang, A., Xia, C., Lin, Q., & Chen, C. (2015).** A single nucleotide polymorphism in primary-microRNA-146a reduces the expression of mature

microRNA-146a in patients with Alzheimer's disease and is associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 4037-4042. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3968>

Zhang, J., Tao, Y., Cai, R., & Wang, Y. (2022). MiR-196a-5p-Rich Extracellular Vesicles from Trophoblasts Induce M1 Polarization of Macrophages in Recurrent Miscarriage. *Journal of Immunology Research*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6811632>

Zhang, J., Wang, R., Ma, Y.-Y., Chen, L.-Q., Jin, B.-H., Yu, H., Wang, J.-C., Gao, C.-F., & Liu, J. (2013). Association Between Single Nucleotide Polymorphisms in miRNA196a-2 and miRNA146a and Susceptibility to Hepatocellular Carcinoma in a Chinese Population. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(11), 6427-6431. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.11.6427>

Zhang, J., Yang, B., Ying, B., Li, D., Shi, Y., Song, X., Cai, B., Huang, Z., Wu, Y., & Wang, L. (2011). Association of pre-microRNAs genetic variants with susceptibility in systemic lupus erythematosus. *Molecular Biology Reports*, 38(3), 1463-1468. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0252-6>

Zhang, J., Zhang, Z. G., Lu, M., Wang, X., Shang, X., Elias, S. B., & Chopp, M. (2017). MiR-146a promotes remyelination in a cuprizone model of demyelinating injury. *Neuroscience*, 348, 252-263. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.02.029>

Zhang, M., Huang, J., Tan, X., Bai, J., Wang, H., Ge, Y., Xiong, H., Shi, J., Lu, W., Lv, Z., & Liang, C. (2015). Common Polymorphisms in the NFKBIA Gene and Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Medical Science Monitor*, 21, 3186-3196. <https://doi.org/10.12659/MSM.895257>

Zhang, Z., Duvefelt, K., Svensson, F., Masterman, T., Jonasdottir, G., Salter, H., Emahazion, T., Hellgren, D., Falk, G., Olsson, T., Hillert, J., & Anvret, M. (2005). Two genes encoding immune-regulatory molecules (LAG3 and IL7R) confer susceptibility to multiple sclerosis. *Genes & Immunity*, 6(2), 145-152. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364171>

- Zhao, C., Sun, X., & Li, L.** (2019). Biogenesis and function of extracellular mirnas. *ExRNA* (C. 1, Sayı April-May-June). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.1186/s41544-019-0039-4>
- Zhao, Y., Ran, Z., Jiang, Q., Hu, N., Yu, B., Zhu, L., Shen, L., Zhang, S., Chen, L., Chen, H., Jiang, J., & Chen, D.** (2019). Vitamin D Alleviates Rotavirus Infection through a Microrna-155-5p Mediated Regulation of the TBK1/IRF3 Signaling Pathway In Vivo and In Vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14), 3562. <https://doi.org/10.3390/ijms20143562>
- Zhi, H., Wang, L., Ma, G., Ye, X., Yu, X., Zhu, Y., Zhang, Y., Zhang, J., & Wang, B.** (2012). Polymorphisms of miRNAs genes are associated with the risk and prognosis of coronary artery disease. *Clinical Research in Cardiology*, 101(4), 289-296. <https://doi.org/10.1007/s00392-011-0391-3>
- Zhornitsky, S., McKay, K. A., Metz, L. M., Teunissen, C. E., & Rangachari, M.** (2016). Cholesterol and markers of cholesterol turnover in multiple sclerosis: relationship with disease outcomes. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 5, 53-65. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2015.10.005>
- Zhou, B., Rao, L., Peng, Y., Wang, Y., Chen, Y., Song, Y., & Zhang, L.** (2010). Common genetic polymorphisms in pre-microRNAs were associated with increased risk of dilated cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta*, 411(17-18), 1287-1290. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.05.010>
- Zhou, C., Zhao, L., Wang, K., Qi, Q., Wang, M., Yang, L., Sun, P., & Mu, H.** (2019). MicroRNA-146a inhibits NF-κB activation and pro-inflammatory cytokine production by regulating IRAK1 expression in THP-1 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7881>
- Zhou, Q., Hou, S., Liang, L., Li, X., Tan, X., Wei, L., Lei, B., Kijlstra, A., & Yang, P.** (2014). *MicroRNA-146a* and *Ets-1* gene polymorphisms in ocular Behçet's disease and Vogt–Koyanagi–Harada syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 73(1), 170-176. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201627>

Zhou, X., Benson, K. F., Ashar, H. R., & Chada, K. (1995). Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature*, 376(6543), 771-774. <https://doi.org/10.1038/376771a0>

Zhou, Y., Chen, M., Simpson, S., Lucas, R. M., Charlesworth, J. C., Blackburn, N., van der Mei, I., Ponsonby, A.-L., & Taylor, B. V. (2018). Common genetic variation within miR-146a predicts disease onset and relapse in multiple sclerosis. *Neurological Sciences*, 39(2), 297-304. <https://doi.org/10.1007/s10072-017-3177-1>

Zhu, Y., Tang, Y., Fan, Y., & Wu, D. (2023). MiR-196a-5p facilitates progression of estrogen-dependent endometrial cancer by regulating FOXO1. *Histology and Histopathology*, 38(10), 1157-1168. <https://doi.org/10.14670/HH-18-572>

Zimmer, P., Bloch, W., Schenk, A., Oberste, M., Riedel, S., Kool, J., Langdon, D., Dalgas, U., Kesselring, J., & Bansi, J. (2018). High-intensity interval exercise improves cognitive performance and reduces matrix metalloproteinases-2 serum levels in persons with multiple sclerosis: A randomized controlled trial. *Multiple Sclerosis Journal*, 24(12), 1635-1644. <https://doi.org/10.1177/1352458517728342>

Zingale, V. D., Gugliandolo, A., & Mazzon, E. (2022). Mir-155: An important regulator of neuroinflammation. *International Journal of Molecular Sciences* (C. 23, Sayı 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23010090>

URL-1:

https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_80/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-146a-5p Erişim Tarihi: 10.10.2023

URL-2:

https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_80/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-155-5p Erişim Tarihi: 16.10.2023

URL-3:

<https://mirdb.org/cgi-bin/search.cgi> Erişim Tarihi: 16.10.2023

URL-4:

<https://rnacentral.org/rna/URS00000DA6A7/9606> Erişim Tarihi: 08.11.2023

URL-5:

https://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan/vert_80/targetscan.cgi?species=Human&gid=&mir_sc=&mir_c=&mir_nc=&mir_vnc=&mirg=miR-196a-5p Erişim Tarihi: 08.11.2023

URL-6:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2910164> Erişim Tarihi: 25.12.2023

URL-7:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs767649> Erişim Tarihi: 05.01.2024

URL-8:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11614913> Erişim Tarihi: 16.01.2024

URL-9:

https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C__15946974_10?CID=&ICID=&subtype= Erişim Tarihi: 10.02.2024

URL-10:

https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C__2212229_10?CID=&ICID=&subtype= Erişim Tarihi: 10.02.2024

URL-11:

https://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping/C__31185852_10?CID=&ICID=&subtype= Erişim Tarihi: 10.02.2024

URL-12:

<https://www.atlasofms.org/chart/turkey/epidemiology/female-to-male-ratio-of-people-with-ms> Erişim Tarihi: 11.06.2024

EKLER

EK-1: Genetik Polimorfizm Çalışma Grubu için Alınan Etik Kurul İzin Onayı

EK-2: Kullanılan Malzemelerin Katalog Numaraları, Üretici Firmaları ve Üretim Yerleri

EK-3: Kullanılan Cihazların Modelleri ve Üretim Yerleri



EK-1



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Ankara Şehir Hastanesi
1 Nolu Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E.Kurul –E1-21-2196

2196-no’lu çalışma

Ankara Şehir Hastanesi Nöroloji Kliniği’nde yapılması planlanan“miR-146a, miR-155 ve miR-196a2’nin Plazma Ekspresyon Seviyeleri ve Genetik Polimorfizmlerinin Multipl Skleroz Riski, Disabilite Skorları ve Birinci Basamakta ve İkinci Basamakta Kullanılan İlaçlar ile İlişkisinin Araştırılması” konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliğiyle uygun görülmüştür.

01/12/2021

Prof. Dr. Hürrem Bodur
Etik Kurul Başkanı

Not: Islak imza silinmiştir.

Çizelge Ek.1: Kullanılan malzemelerin katalog numaraları, üretici firmaları ve üretim yerleri.

Malzeme	Katalog Numarası	Üretici Firma ve Menşei
AMPIGENE qPCR Probe Mix Hi-ROX	ENZ-NUC-106-1000	Enzo Life Science, ABD
Carrier RNA	1068337	Qiagen, Almanya
Etanol	920.026	ISOLAB, Almanya
Etilen diamin tetra asetik asit disodyum tuz (EDTA)	E5134	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Hidroklorik asit (HCl)	07102	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Kloroform	34854	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	M8266	Sigma-Aldrich Co., Çin
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	4346906	Applied Biosystems, ABD
miRCURY LNA RT Kit	339340	Qiagen, Almanya
miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit	339346	Qiagen, Almanya
miRNEasy Serum/Plasma Kit	217184	Qiagen, Almanya
Phosphate buffered saline (PBS)	P4417	Sigma-Aldrich Co., İsviçre
Potasyum klorür (KCl)	sc-203207	Santa Cruz Biotechnology, ABD
Qiazol Liziz Reajeni	79306	Qiagen, Almanya
RNase AWAY™ Surface Decontaminant	MBP-7000	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	L3771	Sigma-Aldrich Co., Japonya
Sodyum klorür (NaCl)	31434	Sigma-Aldrich Co., Danimarka
TaqMan® genotyping master mix	4371355	Applied Biosystems, Avustralya
TaqMan® SNP genotyping assays	4351376	Applied Biosystems, ABD
Tris (hidroksimetil) amino-metan	252859	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Trizma hidroklorür (Tris-HCl)	T5941	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, ABD
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich Co., Fransa

EK-3

Çizelge Ek.2: Kullanılan cihazların modelleri, üretici firmaları ve üretim yerleri.

Cihaz	Model	Marka ve Üretim Yeri
-20°C Buzdolabı	LGex 3410 Index 22A/001	Liebherr, Almanya
+4°C Buzdolabı	LKv 3913 Index 20B/001	Liebherr, Almanya
-86°C Buzdolabı	MDF-U55V-PE	Panasonic, Japonya
Biyogüvenlik kabini	S2020 1.2	Thermo Scientific™, Almanya
Eş zamanlı PCR cihazı	StepOne Plus	Applied Biosystemts, ABD
Hassas tartı	PLJ 300	Kern, Almanya
Kuru blok ısıtıcı	Bio TDB-100	BioSan, Letonya
Laminar akış kabini	LAF-90	MetiSafe, Türkiye
Manyetik Karıştırıcı	ArecX	Velp Scientifica, İtalya
Mikrosantrifüj	MiniSpin®	Eppendorf, Almanya
Otoklav	MLS-3751L	Panasonic, Japonya
PCR cihazı	Mastercycler® Nexus	Eppendorf, Almanya
pH metre	pH 1100 L	VWR, ABD
Saf su cihazı	Minipure	MES Medikal, Türkiye
Saf su cihazı	Smart2Pure 6 UV/UF	Thermo Scientific™, ABD
Soğutmalı santrifüj	Universal 320R	Hettich, Almanya
Su banyosu	462-0353	VWR, ABD
UV-Vis spektrofotometre	NanoDrop™ One/OneC	Thermo Scientific™, ABD
Vorteks	622.01.001	ISOLAB, Almanya